

# **Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der Regulation der Hepatitis B Virus Replikation**

Von der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften**  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

**Dipl.-Ing. Agr. Christina Gehrke**  
geb. am 09.05.1976  
in Gehrden

**2005**

**Referent:** Prof. Dr. W. Müller

**Korreferent:** Prof. Dr. B. Otto

**Tag der Promotion:** 24. August 2005

**Keywords:** hepatitis B virus, mutations, superinfection  
**Schlagworte:** Hepatitis B Virus, Mutationen, Superinfektion

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Hepatitis B Virus .....</b>	<b>8</b>
3.1.1	Epidemiologie und Übertragung .....	8
3.1.2	Virusaufbau.....	8
3.1.3	Replikation.....	11
3.1.4	Diagnose und Immunreaktion.....	13
3.1.5	Prophylaxe und Therapie.....	14
3.1.6	Mutationen.....	15
3.1.7	Koinfektion von Hepatitis B und C Virus .....	17
<b>3.2</b>	<b>Hepatitis C Virus .....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Epidemiologie und Übertragung .....	18
3.2.2	Virusaufbau.....	18
3.2.3	Genom und Genomaufbau .....	19
3.2.4	Replikation.....	21
<b>3.3</b>	<b>Unterschiedliche HBV Modelle .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>Verwendete Plasmide .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>30</b>
4.4.1	Verwendete Zelllinien .....	30
4.4.2	Allgemeine Zellkulturverfahren .....	31
4.4.3	Methoden zur Transfektion somatischer Zellen .....	32
4.4.3.1	Transfektion nach CHEN und OKAYAMA (1987) .....	32
4.4.3.2	Transfektion mit PolyFect Transfection Reagent (Fa. Qiagen) .....	33
4.4.4	β-Galactosidase-Assay .....	33
<b>4.5</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden .....</b>	<b>35</b>
4.5.1	Verwendete Mausstämme .....	35

4.5.2	Injektion der Plasmid-DNA.....	35
4.5.3	Retroorbitale Blutentnahme .....	35
4.5.4	Gewinnung von Serum aus Blut .....	35
4.5.5	Tiertötung und Gewebeentnahmen .....	36
<b>4.6</b>	<b>Mikrobielle Arbeitsmethoden.....</b>	<b>36</b>
4.6.1	Verwendete Bakterienstämme.....	36
4.6.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	36
4.6.3	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> .....	37
<b>4.7</b>	<b>Allgemeine Arbeitsmethoden zur Untersuchung von Nukleinsäuren.....</b>	<b>38</b>
4.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	38
4.7.1.1	Analytische Präparation hochreiner Plasmid-DNA.....	38
4.7.1.2	Präparative Plasmidpräparation (Maxi-Präparation).....	39
4.7.2	Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen .....	39
4.7.3	Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren .....	40
4.7.3.1	Natriumacetat-Ethanol-Fällung .....	40
4.7.3.2	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Aufreinigung .....	40
4.7.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	41
4.7.5	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	41
4.7.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	41
4.7.7	Ligation von DNA.....	41
4.7.7.1	T/A-Klonierung.....	42
4.7.8	Agarosegelelektrophorese.....	42
<b>4.8</b>	<b>Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen.....</b>	<b>43</b>
4.8.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	43
4.8.1.1	Verwendete Oligonukleotide .....	44
4.8.2	Reverse Transkription (RT) und RT-PCR .....	45
4.8.3	Northern Blot.....	46
4.8.3.1	RNA-Gelelektrophorese.....	46
4.8.4	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit <sup>32</sup> P .....	48
4.8.5	Hybridisierung mit radioaktiven Sonden .....	48
4.8.6	Präparation intrazellulärer Kapsid-DNA .....	50
4.8.6.1	Dot-Blot isolierter Kapsid-DNA.....	51
4.8.7	Sequenzierung von DNA .....	52
<b>4.9</b>	<b>Arbeitsmethoden zur Charakterisierung von Proteinen .....</b>	<b>53</b>

4.9.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen.....	53
4.9.2	Isolierung nukleärer Proteine aus Lebergewebe .....	54
4.9.3	Proteinbestimmung nach BRADFORD .....	55
4.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
4.9.5	Coomassie Brilliant Blue Färbung.....	57
4.9.6	Western Blot .....	58
4.9.6.1	Verwendete Antikörper .....	59
4.9.7	Gel-Retentionsanalyse .....	59
4.9.7.1	Herstellung eines doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids .....	59
4.9.7.1.1	Oligonukleotide .....	60
4.9.7.1.2	Verwendete Antikörper .....	60
4.9.7.2	Radioaktive Markierung des doppelsträngigen Oligonukleotids .....	60
4.9.7.3	Trennung der Protein-DNA-Komplexe im Acrylamid-Gel.....	61
<b>5</b>	<b>Ergebnis .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Erhöhung der Virusreplikation Lamivudin-resistenter Hepatitis B Virus Mutanten durch Basale Core Promoter- und Precore-Mutationen .....</b>	<b>63</b>
5.1.1	Untersuchung der Beeinflussung der HBV Replikation durch Mutationen <i>in vitro</i> .....	63
5.1.1.1	Analyse der HBsAg und HBeAg Sekretion der HBV Wildtyp- und Mutationsplasmide .....	64
5.1.1.2	Einfluss der HBV Mutationen auf die Effizienz der intrazellulären Replikation.....	67
5.1.1.3	Analyse der Enkapsidierung der HBV Progeny DNA im Dot-Blot Assay ...	70
5.1.1.4	Vergleich der Polymerase Aktivität der HBV Wildtyp- und Mutationskonstrukte.....	71
5.1.1.5	Einfluss der HBV Mutationen auf die extrazelluläre Sekretion von HBV Virionen .....	73
5.1.1.6	Sensitivität von HBV Wildtyp und Mutationskonstrukten gegen Lamivudin und Adefovir .....	74
<b>5.2</b>	<b>Suppression der HBV Replikation durch das HCV Core Protein.....</b>	<b>78</b>
5.2.1	Untersuchung der Beeinflussung der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein <i>in vitro</i> .....	78

5.2.1.1	Nachweis der Expression des HCV Core-Proteins im Cytoplasma und im Nukleus von HuH-7 Zellen .....	79
5.2.1.2	Reduktion der HBsAg und HBeAg Sekretion ins Medium durch transienter Kotransfektion .....	80
5.2.2	Analyse der Suppression der HBV Replikation durch HCV Core-Protein <i>in vivo</i> .....	81
5.2.2.1	Suppression der HBsAg und HBeAg Expression im Serum kotransfizierter FVB/N Mäuse .....	83
5.2.2.2	Suppression der HBV Transkription bei hydrodynamisch kotransfizierten Mäusen .....	86
5.2.2.3	Isolation enkapsidierter HBV DNA durch Immunpräzipitation und Detektion der HBV Progeny DNA durch Dot-Blot Analyse .....	89
5.2.2.4	Reduktion der HBV Virionen im Serum durch Kotransfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore .....	89
5.2.2.5	Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Injektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore .....	90
5.2.2.6	Beeinflussung der Phosphorylierung und der Aktivierung von STAT-3 .....	93
5.2.2.6.1	Untersuchung der Phosphorylierung von STAT-3 durch Western Blot Analyse .....	93
5.2.2.6.2	Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität von STAT-3 im Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) .....	94
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
<b>6.1</b>	<b>Untersuchung der Virusreplikation Lamivudin-resistenter Hepatitis B Virus Mutanten durch Basale Core Promoter (BCP) - und Precore (PC) – Mutationen .....</b>	<b>96</b>
6.1.1	Untersuchung zur HBsAg und HBeAg Expression der Mutationen .....	96
6.1.2	Analyse zum Einfluss der PC-Mutation in Kombination mit den LMV-resistenten Konstrukten auf die Replikationsintermediate .....	97
6.1.3	Analyse zum Einfluss der PC-Mutation in Kombination mit den LMV-resistenten Konstrukten auf die Replikationsintermediate .....	99
6.1.4	Untersuchung der Konstrukte auf Medikamentenresistenz .....	100
6.1.4.1	Untersuchung der Mutationskonstrukte auf Lamivudinsensitivität .....	101
6.1.4.2	Untersuchung der Mutationskombinationen auf Adefovirsensitivität .....	101

<b>6.2</b>	<b>Analyse der Suppression der HBV Replikation durch das HCV</b>	
	<b>Core-Protein .....</b>	<b>103</b>
6.2.1	Suppression der HBeAg und HBsAg Expression durch das HCV	
	Core-Protein <i>in vitro</i> .....	103
6.2.2	Reduktion der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein <i>in vivo</i> .....	104
6.2.2.1	Mögliche Bereiche des Hepatitis C Virus Core-Proteins für	
	den suppressiven Effekt auf die HBV Replikation .....	105
6.2.3	Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktionswege für	
	den inhibitorischen Effekt auf die HBV Replikation .....	106
6.2.3.1	p50 Aktivierung durch Koinjektion von HBV und HCV	
	Core Expressionsvektor .....	107
6.2.3.2	STAT-3 Aktivierung durch pHBV1.5 Injektion und zusätzlicher	
	Transfektion von pcDNA3.1-HCVcore .....	108
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>128</b>

**Lebenslauf**

**Publikationen**

**Eidesstattliche Erklärung**

**Danksagung**

# 1 Zusammenfassung

Bei chronischer Infektion mit HBV werden häufig Virusmutanten selektiert, die wenig oder kein HBeAg bilden. Die Precore-Mutationen G1896A + C1858T oder die Mutationen A1762T/G1764A im basalen Core Promoter sind in der Mehrzahl der HBeAg negativen Patienten mit chronischer HBV Infektion nachweisbar. Unter Therapie mit Lamivudin (LMV) werden oft medikamentenresistente Virusstämme mit einzelner (rtM204I) oder doppelter (rtL180M + rtM204V) Mutation im Polymerase-Gen selektiert.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein replikationskompetenter HBV-Vektor (Genotyp A) mit verschiedenen Kombinationen aus Mutationen des Core-Bereichs (Wildtyp, Precore=PC, basaler Core Promoter=BCP) und Polymerase Gens (Wildtyp, rtM204I, rtL180M/rtM204V) in Zellkultur auf Replikationsrate und Medikamentenresistenz getestet.

Konstrukte mit alleiniger PC-Mutation hatten keinen Einfluss auf die Replikationseffizienz, während BCP-Mutationen die Replikation steigerten. Vektoren mit alleiniger LMV-Resistenz zeigten eine verminderte Replikationsfähigkeit. In Kombination mit der PC-Mutation erreicht die Replikationsrate LMV-resistenter Stämme hingegen Wildtyp-Niveau. Kombinationsmutanten aus BCP und LMV-Resistenz replizierten sogar stärker als HBV-Wildtyp, ohne die Medikamentenresistenz zu verändern. Alle neun untersuchten HBV-Konstrukte waren gegenüber Adefovir vergleichbar sensitiv.

Ergebnis der Analysen ist, dass Precore und basale Core Promoter Mutationen die Replikationsrate von LMV-resistenten Stämmen erhöhen können, ohne die Medikamentenresistenz zu beeinflussen. Zudem scheint der Einsatz von Adefovir eine effektive therapeutische Option zu sein, wenn Kombinationsmutationen im Core- und Polymerase-Gen nachweisbar sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden molekulare Mechanismen der Beeinflussung der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein analysiert. Hepatitis B Virus (HBV) und Hepatitis C Virus (HCV) Infektionen sind assoziiert mit akuter und chronischer Lebererkrankung. Eine HCV Superinfektion in Patienten mit chronischer HBV Infektion führt zu einer Suppression der HBV Replikation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HCV vermittelte Suppression der HBV Replikation *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Ein HBV replikationskompetentes Konstrukt (pHBV1.5) und ein HCV Core-Protein exprimierendes Plasmid (pcDNA3.1-HCVcore) wurden in FVB/N Mäuse durch hydrodynamische Transfektion injiziert oder in HuH-7 Zellen transient transfiziert. Der Einfluss des HCV Core-Proteins auf die Replikation von HBV wurde in Zellkultur und im Mausmodell untersucht.

Die Kotransfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore *in vitro* führte zu einer signifikanten Reduktion der HBsAg und HBeAg Expression in HuH-7 Zellen.

Die hydrodynamische Transfektion von pHBV1.5 resultierte in der Expression HBV spezifischer Intermediate in Hepatozyten. Sowohl die HBV-DNA der Virionen wie auch die Expression von HBsAg und HBeAg konnten im Blut nachgewiesen werden. Die Kotransfektion führte zu einer spezifischen Suppression der HBV Expression und Replikation. Um potentielle intrazelluläre Mediatoren dieses Effekts zu analysieren wurde die hepatische Aktivierung von NF- $\kappa$ B und STAT-3 untersucht. Durch hydrodynamische Transfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore kommt es zu einer NF- $\kappa$ B p50 Aktivierung. Kernlokalisiertes DNA-bindendes STAT-3 wird durch HBV *in vivo* induziert. Die gleichzeitige Expression von HCV Core-Protein inhibiert diese DNA Bindung.



## 2 Abstract

Chronically infected patients with hepatitis B virus provide a strong selection pressure toward viral variants with less HBeAg expression or none. The most prevalent types of HBV core gene variants are precore-mutants G1896A + C1858T and the basal core promoter mutants A1762T/G1764A. Treatment options include the use of lamivudine (LMV). The major clinical limitation of LMV is the rapid selection of drug-resistant mutants. The most common mutations conferring LMV resistance are a single mutation (rtM204I) or double mutations (rtL180M + rtM204V) in the HBV polymerase protein.

The aim of the study was to analyse the impact of a replication-competent HBV-vector (genotype A) with combination of different mutations in the core-gene (wildtype, precore = PC, basal core promoter = BCP) and polymerase region (wildtype, rtM204I, rtL180M/rtM204V) on viral replication efficacy as well as drug sensitivity in cell culture.

The introduction of the PC mutations into the wt background did not effect replication, whereas BCP mutants increased the viral replication level. Constructs with the LMV resistance mutations alone had decreased replication capacity. The combination of the PC mutations with the LMV resistance mutations restored the wt replication competence in the drug-resistance mutants. Interestingly, the combination of BCP and LMV resistance mutation had a stronger replication capacity compared with wt construct but had no influence on drug-resistance. All nine HBV-constructs displayed comparable sensitivities to adefovir (ADV).

PC and BCP mutations were found to compensate or enhance for replication deficiency of LMV resistant mutants compared to wt. These observations may have major clinical implications, as chronically infected HBV patients undergoing LMV therapy should be closely monitored for HBV DNA levels, especially HBeAg-negative patients. ADV may be a useful therapeutic option in patients with mutations in core or polymerase gene.

Second aim was to analyse the molecular mechanism of hepatitis C virus core protein on HBV replication. Hepatitis-B-virus (HBV) and Hepatitis-C-virus (HCV) infections are associated with acute and chronic liver diseases. HCV superinfection in patients with chronic HBV infection might results in viral interference that suppresses HBV replication. The HCV mediated effect on HBV replication was analysed *in vitro* and *in vivo*.

HBV replication competent construct (pHBV1.5) and HCV core expression plasmid (pcDNA3.1-HCVcore) were injected into FVB/n mice by hydrodynamic transfection or transfected in HuH-7 cells. In this study I established a cellculture system and a mouse-modell to analyse the influence of HCV core protein on HBV replication.

*In vitro* cotransfection assays with pHBV1.5 and pcDNA3.1-HCVcore plasmid in HuH-7 cells resulted in a significant reduction of HBsAg and HBeAg expression. Hydrodynamic pHBV1.5 injection led to synthesize HBV genome in the hepatocytes. The HBV DNA, as well as HBsAg and HBeAg were secreted into the blood. The cotransfection resulted in a specific suppression of HBV expression and replication. Additionally this model allows the analysis of hepatic activation of NF- $\kappa$ B and STAT-3 mediating inhibition of HBV replication. Only the hydrodynamic transfection of pHBV1.5 and pcDNA3.1-HCVcore together induced the NF- $\kappa$ B p50 activation. DNA-binding STAT-3 was localised in the nucleus of HBV injected mice. The cotransfection with HCV core protein led to an inhibition of DNA-binding.

## **3 Einleitung**

### **3.1 Hepatitis B Virus**

#### **3.1.1 Epidemiologie und Übertragung**

Die regionale Verteilung der Hepatitis B Virus (HBV) Infektion variiert sehr stark. In Gegenden wie Südostasien, China und Afrika infizieren sich mehr als die Hälfte der Bevölkerung mit dem Virus, davon leiden mehr als 8 % an einer chronischen Virusinfektion. Regionen wie Nordamerika, Westeuropa und Australien hingegen sind weniger betroffen. Weltweit erreicht die Zahl der HBV Infizierten etwa 400 Millionen [1]. Die klinischen Erscheinungsformen reichen vom gesunden, asymptomatischen Virusträger über die akute oder fulminante Hepatitis zur chronischen Leberentzündung. Die Folgeerkrankungen der chronischen Infektion, wie Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom (HCC) führen weltweit zu mehr als einer Million Todesfälle im Jahr [2]. Weltweit ist das HCC einer der häufigsten Tumore. Die therapeutischen Möglichkeiten sind bis heute äußerst begrenzt [3].

Das Hepatitis B Virus (HBV) infiziert Zellen der Leber und kann eine akute Hepatitis verursachen, die in 90 % der Fälle vollständig ausheilt. Vor allem im Zuge der perinatalen Infektion kann es zu einer chronischen Verlaufsform kommen. Das Hepatitis B Virus ist selbst nicht cytopathogen. Die Pathogenität der Virusinfektion wird von der Immunreaktion des Wirts verursacht, da die Viruselimination über die Zerstörung der befallenen Zellen durch cytotoxische T-Zellen erfolgt. Die Infektion mit HBV erfolgt auf perinatalem Weg, vor allem über Blut- und sexuelle Kontakte [4].

#### **3.1.2 Virusaufbau**

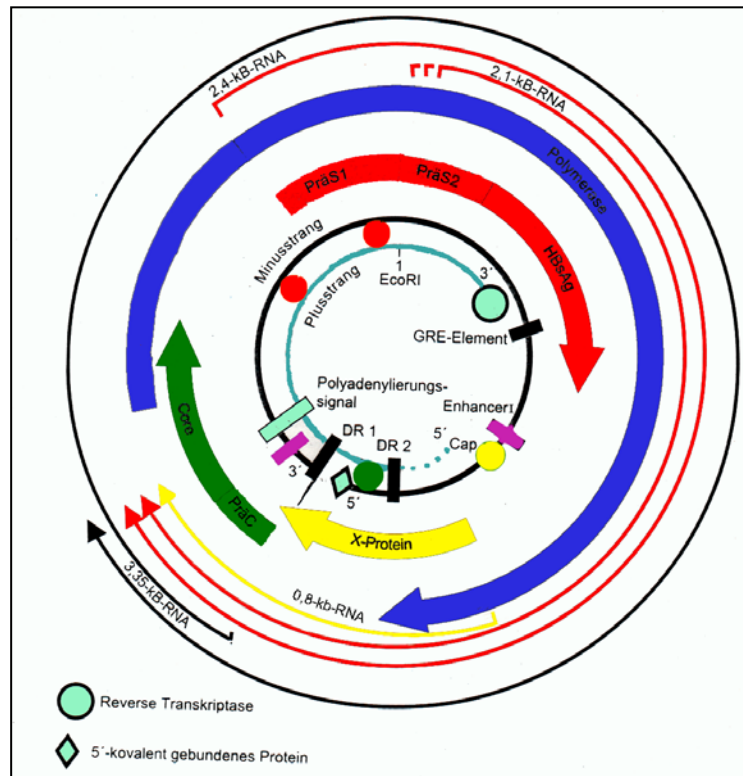
HBV gehört zur Familie der *Hepadnaviridae* und ist Hauptvertreter dieser Virusfamilie. Charakteristisch ist, dass das Genom teilweise doppelsträngige DNA enthält. Alle Hepadnaviren haben ähnliche Hepatropismen und Lebensweisen. Chronische Hepatitis und HCC wurden auch in *Marmota monax* (Waldmurmeltieren)

und weniger häufig in Erdhörnchen (Gattung *Marmotini*) und *Anatidae* (Enten) beobachtet [5].

Die infektiösen Viruspartikel haben einen sphärischen Aufbau mit einem Durchmesser von 42 nm und bestehen aus dem *Hepatitis B surface antigen* (HBsAg). Diese äußere Hülle umschließt das vom HBcAg (*Hepatitis B core antigen*) gebildete Nukleokapsid. Das Nukleokapsid umfasst das virale Genom. Das komplette HBV Genom besteht, je nach Genotyp aus 3181 bis 3221 Basenpaaren. Trotz der geringen Genomgröße, weisen transkriptionelle Regulationssequenzen eine außergewöhnlich hohe funktionelle Diversität auf. Die effiziente Regulation der HBV Replikation hängt dabei von der Interaktionen verschiedener trans-aktiven Faktoren mit deren cis Motiven ab [6].

Die DNA im infektiösen Virion ist nur partiell doppelsträngig und es wird daher zwischen einem vollständigen und einem unvollständigen DNA-Strang unterschieden. Nur der vollständige Strang kodiert für virale Proteine und wird im Replikationsverlauf transkribiert. Er wird als Negativstrang bezeichnet. Der Negativstrang im Virion ist in sich nicht geschlossen, sondern am 5'-Ende mit einem viralen Protein (TP = *terminal protein*) kovalent verbunden. Der unvollständige Strang (Plusstrang) umfasst nur etwa 40 bis 85 % des Genoms (1700 – 2800 Basen) und ist mit seinem 3'-Ende nichtkovalent mit der viralen DNA-Polymerase/Reversen Transkriptase assoziiert. Am 5'-Ende trägt er ein kurzes RNA-Stück aus 17 – 19 Nukleotiden mit einer terminalen *Cap*-Struktur. Der Plusstrang kodiert keine Genprodukte und wird daher auch nicht transkribiert [7].

Der Negativstrang kodiert die vier offenen Leserahmen, die mit S, C, P und X bezeichnet, und in verschiedenen, teilweise überlappenden Leserastern abgelesen werden. Die Transkription der vier mRNA Transkripte (3.5kb 2.4kb, 2.1kb und 0.7kb) wird von den S1-, S2-, C- und X-Promotoren und den *Enhancern* ENH1 und ENH2 kontrolliert [8]. Das S-Gen kodiert für drei verschieden große Formen des Oberflächenproteins (PräS1-, PräS2- und HBsAg), die über die 2.4 und 2.1kb Transkripte exprimiert werden [9].



**Abb. 3.1: Organisation des HBV-Genoms.** Das Genom liegt im infektiösen Virion als partial doppelsträngige DNA vor. An das 5'-Ende des Negativstrangs ist das Terminale Protein (TP) kovalent gebunden. Am 5'-Ende des Plusstrangs befindet sich ein kurzes RNA-Fragment mit einer Cap-Struktur. Mit seinem 3'-Ende ist die virale Polymerase/reverse Transkriptase assoziiert. Die vier Leserahmen sind als breite, farbige Pfeile eingezeichnet. Die zugehörigen Promotoren sind als Kreise in den entsprechenden Farben dargestellt. Die HBV-Transkripte sind als dünne, farbige Pfeile mit jeweiligen Startpunkten eingezeichnet. Alle Transkripte enden am einzigen Polyadenylierungssignal. Die Lage von DR1, DR2 und GRE ist durch schwarze Punkte, die Positionen der Enhancer als lila Rechtecke dargestellt.

Die 2.4kb-mRNA dient der Translation des PräS1-Proteins, während von der 2.1kb-mRNA das PräS2-Protein und das kleine S-Protein translatiert werden. Für die 2.1kb-mRNA gibt es drei mögliche Transkriptionsstartpunkte, die in der Nähe des Start-Codons des PräS2-Proteins nahe beieinander liegen. Die mRNAs sind daher an ihrem 5'-Ende heterogen und abhängig vom Transkriptionsstartpunkt wird ein mittleres PräS2- oder das kleine HBsAg gebildet.

Das C-Gen kodiert für das Core-Protein (HBcAg) und das sezernierte HBeAg (PreC). Das P-Gen überlappt mit allen anderen Leserahmen und kodiert für das P-Protein. Das Genprodukt besteht aus mindestens vier funktionellen Domänen, die das Terminale Protein (TP), eine DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase und eine RNaseH einschließen. Vorlage für die Translation der PreC/C- und P-Proteine

sind verschiedene 3.5kb große Transkripte die von unterschiedlichen Startpunkten im Core-Promotor initiiert werden. Von der pregenomischen RNA werden das HBcAg und die Polymerase translatiert, während über die PreC-mRNA nur das PreC-Protein gebildet wird, das im Gegensatz zum C-Protein ins ER geschleust und dort prozessiert wird. Als HBeAg wird es dann von der Zelle sezerniert. Die pregenomische RNA dient weiterhin als Vorlage zur reversen Transkription bei der Virusreplikation [8].

Der X-Leserahmen kodiert für das HBx-Protein, das verschiedene regulatorische Funktionen ausübt, wie z. B. Transaktivierung viraler Promotoren. Es wird von einem eigenen 0.7kb-Transkript gebildet. Das HBx-Protein ist offensichtlich in die Entwicklung des HCCs involviert. HBx transgene Mäuse entwickeln per se HCC's [10]. Es moduliert viele zelluläre Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionswege, kontrolliert den Zellzyklus, Apoptose, Proteindegradation und Karzinogenese [10].

Alle vier mRNAs enden an einem einzigen gemeinsamen Polyadenylierungssignal kurz vor dem 3'-Ende des Negativstranges. Das HBV-Genom weist weiterhin zwei repetitive Elemente DR1 und DR2 (*direct repeat*) auf, die eine Länge von je 11 Basenpaaren haben und durch etwa 225 Basenpaare voneinander getrennt sind. DR1 liegt direkt am 3'-Ende des Negativstranges, während DR2 an die terminale *Cap*-Struktur am 5'-Ende des Plusstranges anschließt [4, 11, 12]. Abbildung 3.1 zeigt schematisch die Organisation des HBV-Genoms.

### 3.1.3 Replikation

Der Replikationszyklus des Hepatitis B Virus wurde an Tiermodellen (*Anatidae*) und in Zellkultur erforscht. Das Oberflächenprotein des Virus bindet an eine membranständige Form der Carboxypeptidase D (gp180) als zellulären Rezeptor, gefolgt von der Aufnahme der Viruspartikel mittels rezeptorvermittelter Endocytose [13]. Nach Eintritt in die Zelle und Freisetzung der Nukleinsäure wird das virale Genom in den Kern transportiert. Der unvollständige DNA Strang wird durch die mit ihm assoziierte Polymerase vervollständigt. Dabei wird das RNA-Oligonukleotid abgebaut und das TP-Protein entfernt. So entsteht ein zirkulär geschlossener DNA-Doppelstrang (cccDNA). Die cccDNA dient als *Template* für die

Synthese aller viralen Transkripte, die in virale Proteinproduktion und Replikation involviert sind [14]. Nach Anheften der 5'-*Cap*-Struktur und Polyadenylierung durch zelluläre Enzyme, werden die mRNAs ins Cytosol gebracht, wo die Translation der Virusproteine beginnt. Die Synthese der Oberflächenproteine findet an der Membran des endoplasmatischen Retikulums statt, in der sie über vier Transmembrandomänen verankert werden (Abb. 3.2) [7,15].

Die 3.5kb mRNA dient sowohl für das Core- und das P-Protein und fungiert als pregenomische RNA (pgRNA) für die virale Replikation. Die 2.4 und 2.1kb Transkripte kodieren für das Oberflächenprotein und das 0.7kb Transkript kodiert für das X-Protein. Die RNA Polymerase des Wirtes synthetisiert die viralen Transkripte [16].

Die Replikation des HBV Genoms findet im Nukleokapsid statt. Bei der Initiation der Replikation bindet die DNA Polymerase Sequenzen zwischen der DR1- und DR2-Region am 5'-Ende der pregenomischen RNA. Die RNA bildet hier eine stabile Haarnadelschleife ( $\epsilon$ -Signal). Dadurch wird die Interaktion mit der aminoterminalen Domäne der Polymerase vermittelt. Der gesamte Komplex wird dann durch Anlagerung von Core-Proteinen in Kapside verpackt [17].

Die Synthese des Negativstranges startet am DR1, am 5'-Ende der pregenomischen RNA, wobei die N-terminale Domäne der Polymerase mit der OH-Gruppe eines Tyrosinrestes den *Primer* für die reverse Transkription stellt. Sie bleibt als Terminales Protein (TP) am 5'-Ende des Negativstrangs kovalent gebunden. Zunächst wird nur ein kurzes Oligonukleotid gebildet, das nach Translokation des gesamten Komplexes zum 3'-DR1, die eigentliche Negativstrangsynthese einleitet. Während der DNA-Synthese wird die pregenomische RNA simultan durch die RNaseH bis auf ihr 5'-Ende degradiert. Das verbleibende RNA-Fragment trägt am 5'-Ende weiterhin die *Cap*-Struktur der 3.5kb mRNA und dient nach erneuter Translokation als *Primer* für die Plusstrangsynthese mit Startpunkt am DR2 des Negativstrangs. Der Plusstrang wird synthetisiert bis das Terminal Protein am 5'-Ende des Negativstrangs erreicht ist. Es entsteht ein offenes zirkuläres DNA-Molekül.

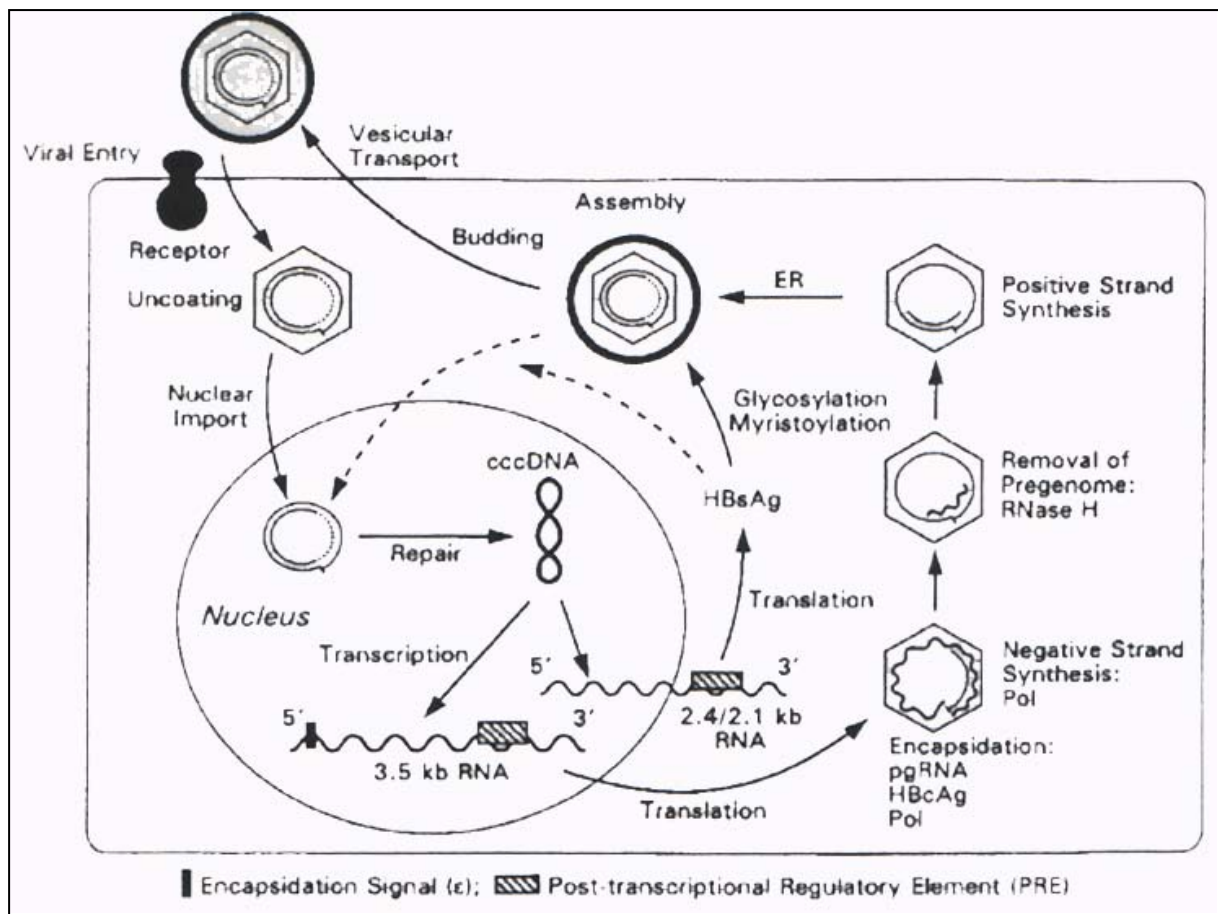


Abb. 3.2: Replikationszyklus von HBV [18].

Vervollständigte Viruskapside werden ins ER aufgenommen. Dort erhalten sie die Hüllmembran mit den eingelagerten Oberflächenproteinen und werden anschließend über den konstitutiven Sekretionsweg aus der Zelle ausgeschieden, oder sie geben die neu synthetisierte DNA für eine weitere Replikation erneut in den Zellkern ab [11, 18].

### 3.1.4 Diagnose und Immunreaktion

Der Nachweis von HBV DNA im Serum durch Polymeraseketten-Reaktion (*polymerase chain reaction* = PCR) ist die beste Indikation für eine aktive virale Replikation. Die Quantifizierung der HBV DNA ist hilfreich zur Ermittlung der geeigneten Therapie und dient als Gradmesser für die Ansteckungsgefahr [19].

Zur serologischen Diagnose einer akuten Hepatitis B wird die Serumkonzentration an Transaminasen, das Vorhandensein von HBsAg und HBeAg und die Konzentration von IgM gegen HBsAg bestimmt. Antikörper gegen das Oberflächenprotein-Antigen des Virus (HBsAg) können in Patienten nach akuter Hepatitis B Infektion und in geimpften Personen nachgewiesen werden. Sie verleihen einen Immunschutz. Die Diagnose von chronischen Verlaufsformen ergibt sich aus dem wiederholten Nachweis von HBeAg über einen Zeitraum von sechs Monaten. Der Durchseuchungsgrad der Bevölkerung erfolgt durch Bestimmung der Antikörper gegen das HBcAg (anti-HBc) [20]. Diese Antikörper sind bei allen Personen, die mit dem Hepatitis B Virus Kontakt hatten lebenslang vorhanden.

Das Immunsystem des Infizierten reagiert auf das Virus mit der Infiltration cytotoxischer T-Zellen, im speziellen HLA-Klasse I-restringierende CD8+ Zellen gegen das HBcAg, wodurch infizierte Zellen erkannt und Apoptose induziert wird [21]. Auch CD4+ Zellen werden aktiviert. Hierdurch wird die Synthese von Zytokinen erhöht, die T-Zell Proliferation stimuliert und zusätzlich die Antwort von B-Helferzellen induziert. Antikörper gegen Epitope aller HBsAg-Formen wirken neutralisierend und blockieren daher weitgehend die Ausbreitung durch das Blut [2].

### 3.1.5 Prophylaxe und Therapie

Prophylaktisch impft man mit gentechnologisch hergestelltem HBsAg. In Deutschland und vielen anderen Ländern wird die allgemeine Impfung aller Säuglinge und ungeimpften Jugendlichen empfohlen. Der Impferfolg sollte durch eine Antikörperbestimmung kontrolliert werden. Ein geringer Anteil der Geimpften zeigt aus genetischen Gründen eine ungenügende Immunantwort (so genannte *Non-Responder*). Hier lässt sich teilweise durch die zusätzliche Gabe von Interleukin-2 eine Immunantwort gegen den Impfstoff erzielen [9, 22].

Patienten mit chronischer HBV Infektion werden mit rekombinanten Interferon- $\alpha$  behandelt. Chronisch infizierte Personen haben eine unzureichende Antwort auf endogenes Interferon. Die Gabe von rekombinantem Interferon hat immunmodulatorische und antivirale Effekte, wie das Bereitstellen von HLA Klasse I Molekülen an der Membran der Hepatozyten. Somit wird die Lyse durch CD8+ T-Zellen gefördert und die virale Protein-Synthese inhibiert. In über 30 % der Fälle wird



durch den Einsatz von Interferon das Virus eliminiert. In Kombination bzw. alternativ wird mit Lamivudin (3'-Thiactidin) therapiert [23]. Mit Lamivudin wurde 1999 erstmals ein Nukleosid-Analogon für die Behandlung der chronischen Hepatitis B Infektion zugelassen. Die Substanz inhibiert die Replikation viraler DNA durch direkte Interaktion mit der reversen Transkriptase, in dem sie mit den natürlichen Nukleotiden um die Inkorporation in die virale DNA konkurriert und bei Einbau zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führt. Nukleosid-Analoga müssen wie natürliche Nukleotide zu den 5'-Triphosphaten phosphoryliert werden, um ihre aktive Form zu erhalten. Die Phosphorylierung erfolgt durch zelluläre Enzyme wie Kinasen, Nukleotidasen und Phosphotransferasen.

Bei einer langfristigen Behandlung, kommt es allerdings häufig zur Entwicklung von Resistenzen (16 % der Patienten in einem Jahr) hervorgerufen durch Mutationen im YMDD (Tyrosin-Methionin-Asparagin-Asparagin) Motiv des DNA Polymerasegens [2, 24].

Als weiteres Nukleosid-Analogon kann Adefovir (PMEA) für die Behandlung eingesetzt werden [25]. Adefovir Dipivoxil hat eine ähnliche anti-HBV Aktivität wie Lamivudin. In klinischen Studien mit HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Patienten mit chronischer Hepatitis B Infektion und in Patienten mit Lamivudin-Resistenz, zeigte Adefovir eine signifikante Reduktion des HBV DNA Niveaus sowie eine Verbesserung der Leberhistologie und ALT Werte. Während einer 48 wöchigen Studiendauer wurden keine resistenten HBV Mutanten selektioniert. 80 Wochen nach Beginn einer Adefovir Therapie konnte durch Sequenzierung allerdings eine rtN236T Mutation nachgewiesen werden. Allerdings treten Resistenzen gegen Adefovir weniger häufig auf als gegen Lamivudin [26].

### 3.1.6 Mutationen

HBV ist ein sehr kleines DNA Virus. Die Replikation erfolgt durch einen RNA-replikativen Zwischenschritt, wozu eine aktive virale reverse Transkriptase/Polymerase benötigt wird. Ähnlich wie beim HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) fehlt auch der Polymerase des Hepatitis B Virus die *proofreading* Funktion. Daher ist beim HBV die Mutationsrate 10 Mal höher als bei anderen DNA Viren.

Bei vielen chronisch infizierten Patienten, die auch nach Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe positiv für HBV-DNA blieben, wurden Mutationen im PreC/C-Gen nachgewiesen. Die Mutation in der Precore-Region bei Nukleotid (nt) 1896 (oder Codon 28) führt zu einem Austausch von Guanin zu Adenin. Dadurch entsteht ein Stop-Codon, wodurch keine HBeAg Expression stattfindet [24, 27]. Diese Mutation befindet sich in der  $\varepsilon$ -Region, die hochkonserviert ist und für die Initialisierung der Enkapsidierung im viralen Replikationszyklus notwendig ist.

Die Mutation G1896A tritt ausschließlich bei HBV-Genotypen auf, die an Position 1858 ein Thymidin (1858T, Genotyp B, C und D) aufweisen. Der Austausch von G zu A von Nukleotid 1896 verstärkt die Haarnadelstruktur des  $\varepsilon$ -Verpackungssignals in der pregenomischen RNA [23, 24].

Doppelmutationen in der Region des basalen Core Promoters (BCP) konnten bei Patienten mit chronischer und fulminanter Hepatitis B nachgewiesen werden. Zusätzlich auch bei Patienten, die aufgrund einer Transplantation mit Immunsuppressiva behandelt wurden. Bei diesen Mutationen kommt es zu einem Austausch von Adenin zu Thymidin bei Nukleotid 1762 (A1762T) und von Guanin zu Adenin bei n 1764 (G1764A). Diese Veränderungen führen zu einer Reduktion der HBeAg Expression von 70 % und erhöhen die virale Replikation [28, 29]. Die Verminderung der HBeAg Produktion ist auf die verminderte Bindung einiger Transkriptionsfaktoren zurückzuführen, die aber nicht die Menge der pregenomischen RNA beeinflussen. Da der Bereich des BCPs mit dem X ORF überlappt, kommt es auch hier zur Mutation, die in einer putativen Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor *hepatocyte nuclear factor 1* (HNF-1) resultiert [30, 31, 32].

Sowohl das HBc wie auch das HBe Antigen sind wichtig für die Generierung der Immunantwort gegen das Hepatitis B Virus. Durch die Bildung von HBeAg negativen Mutanten ist es dem Virus möglich, dem Immunsystem zu entgehen. Auch eine Behandlung mit Interferon- $\alpha$  ist bei HBeAg-negativen Patienten weitgehend erfolglos. In solchen Fällen ist daher meist eine Behandlung mit Lamivudin indiziert [24].

Die Behandlung mit Lamivudin übt allerdings einen hohen Selektionsdruck aus. Dieses hängt zusätzlich von der Dauer der Therapie ab. 66 % der Patienten zeigten Mutationen innerhalb der ersten drei Jahre der Therapie [33]. Die Entwicklung von Mutationen unter der Behandlung mit dem Nukleosid-Analogon wurde gleichermaßen in HBeAg negativen und positiven Infizierten festgestellt. Die

häufigsten Mutationen, die eine LMV Resistenz verleihen, sind im YMDD Motiv lokalisiert. Hier kommt es zum Austausch von Aminosäuren bei Codon 204, wo Methionin durch Isoleucin (rt M204I) oder Valin (rtM204V) ersetzt wird. Die rtM204V Mutation tritt häufig gemeinsam mit einem Leucin zu Methionin Austausch im Codon 180 (rtL180M). Patienten bilden nach ausgedehnter Lamivudin Therapie diese Varianten und das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch persistente HBeAg Expression, eine Erhöhung der Transaminasewerte (AST/ALT) und der DNA Serumkonzentration [24].

### **3.1.7 Koinfektion von Hepatitis B und C Virus**

Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus (HCV) gehören verschiedenen Virusfamilien an. Die Struktur des Genoms und die Mechanismen der Replikation sind unterschiedlich. Aber aufgrund der Tatsache, dass sowohl HBV als auch HCV perinatal übertragen werden, treten gehäuft HBV/HCV Koinfektionen auf. Studien haben gezeigt, dass konkurrierende HCV und HBV Superinfektionen häufig mit einem fulminanten Verlauf der akuten Hepatitis assoziiert sind. In diesem Fall sind eine chronische Lebererkrankung und ein schnelleres Fortschreiten der Krankheit zu beobachten. Gleichzeitig hat die HCV Infektion einen inhibitorischen Effekt auf die HBV Replikation. Im Gegensatz zur Koinfektion von HBV mit dem Hepatitis Delta Virus (HDV) kommt es bei einer Infektion von HBV mit HCV auch zur Suppression der Expression der HBV Oberflächenproteine im Gewebe und im Serum [34]. *In vitro* Studien von Shih und Mitarbeitern zeigten, dass insbesondere das Core-Protein für den suppressiven Effekt verantwortlich ist [35].

## **3.2 Hepatitis C Virus**

### **3.2.1 Epidemiologie und Übertragung**

Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde lange Zeit den so genannten NonA-/NonB-Hepatitisviren zugeordnet. Es sind zwölf verschiedene HCV Genotypen aus verschiedenen geographischen Regionen bekannt. Weltweit schätzt man die Zahl der Personen, die chronisch mit dem Hepatitis C Virus infiziert sind, auf 170 Millionen. In Deutschland liegt die Prävalenz bei 0,6 %. Am häufigsten wird das HCV bei Drogenabhängigen durch das gemeinsame Benutzen von Spritzen verursacht. Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind in seltenen Fällen Sexualverkehr sowie Kontakt mit infizierten Patienten bei mangelhaften hygienischen Verhältnissen. Das Virus kann während der Schwangerschaft von der Mutter auf das Kind übertragen werden.

Das Hepatitis C Virus gehört zur Familie der Flaviviren. Aufgrund seiner molekularbiologischen Charakteristika wird HCV als eigenes Genus (Hepacivirus) in die Familie der *Flaviviridae* [36] eingeordnet. Die Infektion mit dem humanen HCV kann zu einer chronischen Hepatitis und der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms führen [37].

### **3.2.2 Virusaufbau**

Die infektiösen Viren haben einen Durchmesser von 40 bis 50 nm. Die sphärischen Kapside, die nur aus einem viralen Protein (Core-Protein) bestehen, sind von einer Hüllmembran umgeben. Das Innere des Kapsides enthält das RNA-Genom, das mit dem stark basischen Core-Protein in enger Wechselwirkung steht [38].

### 3.2.3 Genom und Genomaufbau

Das HCV Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA in Plusstrangorientierung, das die Größe von etwa 9.6kb besitzt. Von der HCV RNA wird ein Polyprotein von circa 3000 Aminosäuren abgelesen. Der HCV-Leserahmen ist flankiert von einer 3' und einer 5' nichttranslatierten Region [39]. Diese nicht translatierten Bereiche sind unter den unterschiedlichen Genotypen hochkonserviert. Die Struktur des HCV Genoms weist zu den anderen Genera der *Flaviviridae* Unterschiede auf:

Die nichttranslatierte Region am 5'-Ende ist mit 340 Basen deutlich länger und hat die Funktion einer IRES-Sequenz (*Internal ribosomal entry site*). Mittels der IRES wird die Bindung von Ribosomenuntereinheiten vermittelt die essentiell für die Translationregulation des Polyproteins ist [40].

Im Gegensatz zu anderen Flaviviren fehlt im HCV Genom der M-Protein kodierende Bereich. Im Anschluss an die Kapsid kodierende Sequenz folgt daher direkt der ORF für das E1-Protein. E1 ist ein glycosyliertes Membranprotein mit einem Molekulargewicht von circa 33 kDa. 3' von E1 liegt der E2 kodierende Bereich (E2, gp68 – 72) sowie der eines kleinen Proteins (p7) [41].

An die C-E1-E2 kodierenden Bereiche schließen sich die der Nichtstrukturproteine NS2 bis NS5B an (Abb. 3.3). Während der Translation prozessieren zelluläre und virale Proteasen das entstehende Polyprotein in die drei viralen Strukturproteine und mindestens sechs virale Nichtstrukturproteine. Das C-Protein bildet das etwa 21 kDa große Kapsid. Das carboxyterminale Ende des C-Proteins ist stark hydrophob. Es wirkt als Signalpeptid für das E1-Protein, ist damit für die Inkorporation des in Translation befindlichen Polyproteins in die ER-Membran verantwortlich und induziert die Spaltung durch zelluläre Signalpeptidasen.

Das glycosylierte E1-Protein ebenso wie das E2-Protein des HCV weisen Sequenzhomologien zum E1-Protein der Pestiviren auf. Im Genom der Flaviviren befindet sich an der dem E2-Protein entsprechenden Position im Polyprotein das Nichtstrukturprotein NS1. Letzteres fehlt beim HCV. Es ist unklar, ob das E2-Produkt des Hepatitis C Virus sich im Verlauf der Evolution durch eine Fusion von einem Membranprotein mit NS1-Sequenzen entwickelt hat. Das E2-Protein ist im Gegensatz zum NS1-Protein der Flaviviren, das mit der Cytoplasmamembran

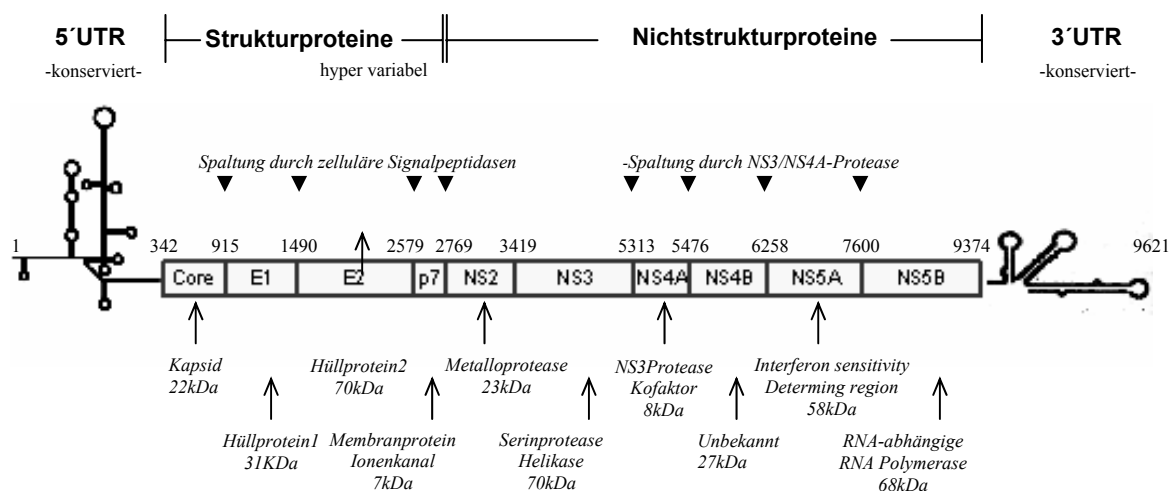
assoziiert ist und sezerniert wird, fest in der Virusmembran verankert und wird nicht von der Zelle abgegeben. Die Proteine E1 und E2 bilden Heterodimere [42].

Das Nichtstrukturprotein NS2 ist essenzieller Kofaktor der NS3-Protease. Er stellt die katalytische Domäne einer  $Zn^{2+}$ -abhängigen Protease dar, die zwischen NS2 und NS3 spaltet.

Auch das NS3-Protein besitzt Proteaseaktivität. Diese ist hauptsächlich für alle Spaltungen in den Regionen des Polyproteins verantwortlich, die der NS3-Domäne folgen. NS3 interagiert mit dem NS4A-Protein und bildet mit diesem Heterodimere. Das bifunktionelle NS3-Protein besitzt eine aminoterminal Proteaseaktivität. In der carboxyterminalen Region befinden sich NTP-Bindungsstellen und die Helicaseaktivität. Letztere ist essentiell für die bei der Genomreplikation und Translation stattfindenden Entwindung der RNA [43].

NS4A ist ein kleines Protein von ca. 8 kDa (Abb. 3.3), das neben der Funktion als Kofaktor der NS3/NS4-Protease auch an der Phosphorylierung des NS5A-Proteins beteiligt ist. Die Funktion des 27 kDa großen NS4B-Proteins ist nicht bekannt.

Das NS5-Protein ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und notwendig für die Replikation des RNA-Genoms [44].



**Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Genoms des Hepatitis C Virus.** Dargestellt sind das Polyprotein sowie die beiden 5' und 3' nichttranslatierten Bereiche mit ihren mutmaßlichen Sekundärstrukturen. Die Spaltung des Polyproteins in ihre einzelnen Proteine wird durch zelluläre, bzw. virale Proteasen umgesetzt. Die prozessierten Proteine sind in ihrer Funktion und Molekulargröße angegeben.

### 3.2.4 Replikation

Beim Hepatitis C Virus bindet das E2-Protein an das CD81-Protein (25 kDa). Dieses Protein durchspannt die Cytoplasmamembran mit vier Transmembranregionen. Zwei Domänen sind extrazellulär exponiert [45].

Nach der Adsorption an die Zelloberfläche gelangt das Virus durch Endocytose in die Zelle (Abb. 3.4). Durch Ansäuerung des Endosomens über eine ATP-abhängige H<sup>+</sup>-Ionenpumpe verschmilzt die Endosomenmembran unter Mithilfe des E-Proteins mit der des Virus und entlässt die genomische (+)-Strang-RNA ins Cytoplasma. Das 5'-Ende des Genoms interagiert mit zellulären Ribosomenuntereinheiten. Die im nicht translatierten Teil des 5'-Endes lokalisierte IRES-Sequenz vermittelt die Bindung von Ribosomen [46]. Die Elongation des Polypeptids stoppt kurzzeitig, wenn das C-Protein nach begonnener Translation im aminoterminalen Bereich des Polyproteins vorliegt. Der hydrophobe Teil des C-Proteins wirkt hier als Signalpeptid. Er interagiert mit dem *Signal Recognition Particle* (SRP), einem aus mehreren zellulären Proteinen bestehenden Komplex, und bewirkt den Transport zum endoplasmatischen Retikulum [47]. Dort wird die wachsende Aminosäurekette durch die Membran des ER geschleust, wobei die Transmembrandomäne der E-Proteine das Polypeptid in der Lipidschicht verankern. Die Signalasen (Proteasen, die kotranslational schneiden [48]) führen die Prozessierungen zwischen den C-, E1-, E2- und p7-Proteinen durch. Für die weiteren Spaltungen des Polyproteins ist die NS2/NS3-Protease verantwortlich. Sobald die RNA-abhängige RNA Polymerase (NS5B) im Cytoplasma prozessiert vorliegt, transkribiert sie die genomische (+)-Strang RNA in den Minusstrang, der vornehmlich der Neubildung und Vervielfältigung von genomischer Plusstrang-RNA, dient [49].

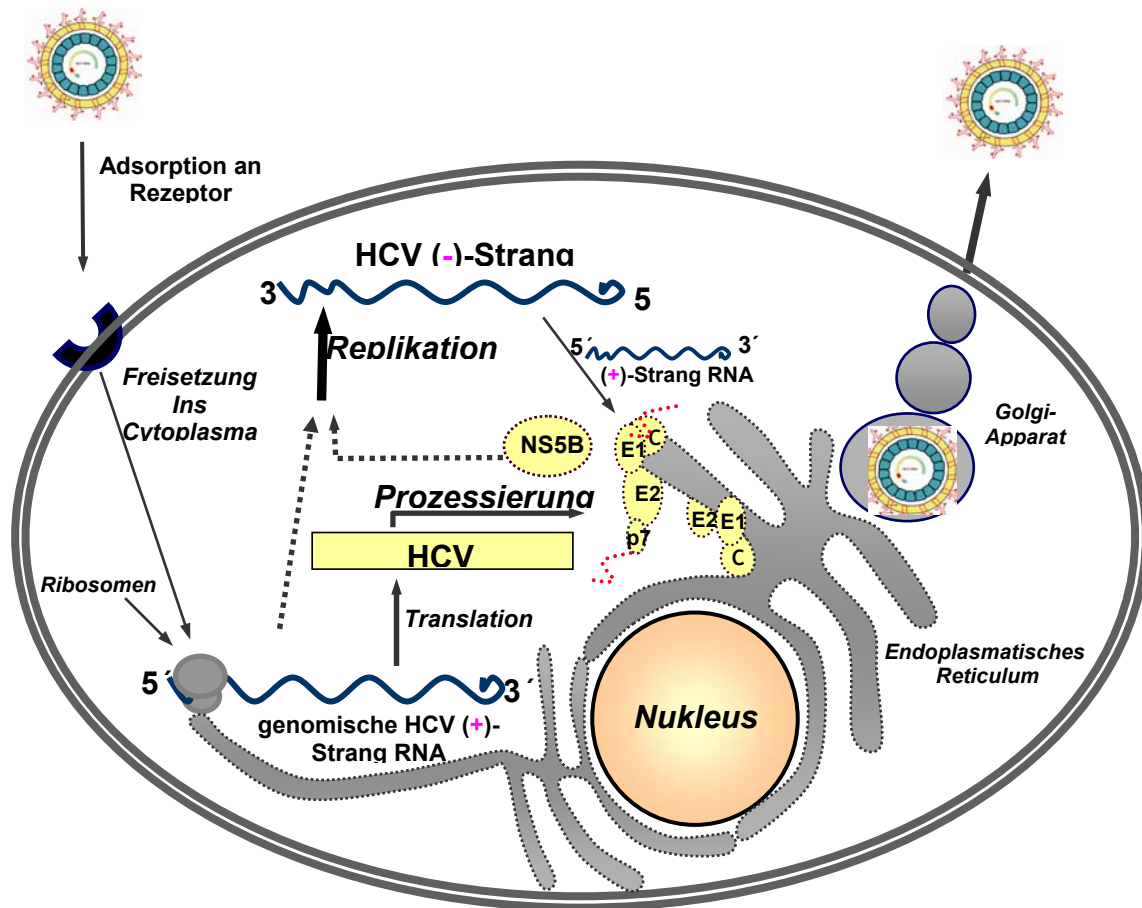


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des HCV Replikationszyklus.

Die Morphogenese zu infektiösen Partikeln erfolgt an der Membran des ER. Die E1- und E2-Polypeptide beim HCV werden im Verlauf der Translation in die Lipidschicht integriert. Membranassoziierte Core-Proteine interagieren zum einen mit den carboxyterminalen Bereichen der E-Proteine und zum anderen mittels der basischen Aminosäuren mit den neu synthetisierten Plusstrang-RNAs. Sie initiieren so die Einstülpung der Membran zu neuen Partikeln. Durch den Golgi-Apparat werden die neuen Viren zur Zelloberfläche gebracht und dort durch Verschmelzung von ER Membran und Zellmembran in den Extrazellarraum entlassen.



### 3.3 Unterschiedliche HBV Modelle

Zur Untersuchung der Beeinflussung der HBV Replikation stehen Zellkultursysteme wie die Transfektion in HuH-7 Hepatomzellen zur Verfügung. Ein reproduzierbares Gewebekulturmodell zur Untersuchung der HBV Infektion existiert allerdings nicht. Auch eine Infektion immunologisch gut bekannter Versuchstiere ist nicht bekannt. Das derzeitige Wissen basiert aus Studien von Enten (*Anatidae*) (Duck HBV = DHBV) und Woodchuck (*Marmota monax*) HBV (WHV) [50], HBV infizierten Schimpansen (*Pan troglodytes*) [51] und HBV transgenen Mäusen (*Mus musculus*) [52]. Alle Modelle sind nicht ideal, da DHBV und WHV sich von der humanen HBV unterscheiden. Immunologische Studien erweisen sich als schwierig, weil beide Tierstämme immunologisch uncharakterisiert sind. Experimente mit Schimpansen sind sehr kostspielig und für reine Grundlagenforschung ethisch problematisch. Transgene Mäuse sind immunologisch tolerant. Als alternatives Modell für die Untersuchung der HBV Replikation – neben Zellkulturexperimenten – dient die hydrodynamische Transfektion über die Schwanzvene von Mäusen. Wobei ein hohes Volumen einer isotonischen Lösung wie NaCl mit dem linearisierten HBV Plasmid in kurzer Zeit hydrodynamisch transfiziert wird. Die Injektion dieses hohen Volumens führt zu einer Expression HBV spezifischer Antigene und RNA in Hepatozyten [53].

### 3.4 Ziele der Arbeit

Das Hepatitis B Virus stellt trotz guter Impfmöglichkeiten immer noch ein großes Problem dar. So sind, vornehmlich in Ländern der dritten Welt, weltweit etwa 400 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert. Patienten mit chronischer HBV Infektion werden mit rekombinanten Interferon- $\alpha$  behandelt. Bei dieser Behandlung liegt die Erfolgsrate allerdings nur bei etwa 30 %. Deswegen werden Kombinationsbehandlungen mit dem Nukleosid-Analogon Lamivudin angestrebt. Die Therapie mit Lamivudin übt allerdings einen hohen Selektionsdruck auf das Virus aus und führt zu Mutationen im YMDD Motiv (Polymerase-Gen). Die Beeinflussung der HBV Replikation durch unterschiedliche Mutationen (YMDD, BCP und PC) ist nicht

eindeutig geklärt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte zum einen untersucht werden, wie die Kombination aus HBeAg-Minus-Mutationen und LMV-Resistenz Virusreplikation und Medikamentenresistenz beeinflusst.

Des Weiteren wird die Replikation des Hepatitis B Virus durch Superinfektion mit Hepatitis C Virus supprimiert. Eine Koinfektion mit beiden Viren kommt aufgrund gleicher Übertragungswege häufig vor. Mögliche Mechanismen der Koinfektion von HBV und HCV und eine damit einhergehende Auswirkung auf die Replikation des Hepatitis B Virus soll *in vitro* und in einem *in vivo* Mausmodell untersucht werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese	System BM 200/2, Fa. Serva System BM100, Fa. Serva
Bakterieninkubator	BE 600, Fa. Memmert
β-Counter	Radicon, FA. Herfurth
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	Typ B3 6220, FA. Heraeus Instruments
Corex-Röhrchen	Corex 30 ml, FA. Omnilab
Dewargefäß	Fa. Nalgene
Dispenser	Fa. Eppendorf
Elektroporator	Gene Pulser II, Fa. BIO-RAD
Expositionskassetten	Hypercassette 18 x 24 cm, Fa. Amersham Life Science Hypercassette 35 x 43 cm, Fa. Amersham Life Science
FACS	FACSCalibur, Fa. Becton Dickinson Software Cell Quest 3.1f
Flachbettscanner	Scanmaster, Fa. Microtek
Feinwaage	Fa. Sartorius
Gel-Dokumentation	Gel Doc 100 mit Software, Fa. Bio-RAD Molecular Analyst Version 2.1.2, Fa. Bio-RAD P91Thermoprinter, Fa. Mitsubishi
Geltrockner	Slab Gel Dryer Modell SE 1160 mit Refrigerated Vapor Trap, Fa. Savant und Vakuumpumpe Duo 5, Fa. Pfeiffer
Glaspotter	5 bis 50 ml, Fa. B. Braun Biotech International
Hydrisierungsöfen	Typ 400 Hy-E, Fa. Bachofer
Hybridisierungsflasche	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Kapillarsequenzierer	ABI Prism 310, FA. Applied Biosystems Software Data Collection Version 1.04 Sequence Analysis Version 2.2.1
Kühleinrichtungen	4°C Profi line, Fa. Liebherr Kühlraum -20°C Liebherr comfort Gefrierraum, Fa. Viessman -80°C Gefrierschrank, Typ 6485, Fa. GFL Gefriertruhe, Typ 6374, Fa. GFL
Kühlzentrifugen	Stickstofftank Biosafe MD, Fa. Messer 2K15 mit Rotor Nr. 12128, Fa. Sigma 5417R mit Rotor FA45- 24-11, Fa. Eppendorf
Kühlwasserbad	Fa. Julabo
Laborwaage	Fa. Sartorius
Magnetrührer	MR 3001 K, Fa. Omnilab
Mehrkanalpipetten	Transferpette-8, 2,5-25 µl, Fa. Brandt Transferpette-8, 30-300µl, Fa. Brandt

Mikromanipulator	Mikroskop IX70, Fa. Olympus mit Objektkühlung; Transferrman, Fa. Eppendorf und CellTram, Fa. Eppendorf
Mikroskope	ITM 2, Fa. Olympus Wilovert S, Fa. Hund
Mikrowelle	Fa. Panasonic
Netzgeräte	Electrophoresis Power Supply PS3002, Fa. Gibco Electrophoresis Power Supply EPS 200, Fa. Pharmacia Biotech
pH-Meßgerät	GPBR 1400 Digital pH/mV-Meter, Fa. LAT
Pipetten	Reference 0,1-10µl, 10-100µl, 50- 200µl, 100- 1000µl, 500-2500µl , FA. Eppendorf
Pipettierhilfe	Akku-Jet, Fa. Brand
Photometer	Lambda Scan 200e, Fa. MWG Biotech Software Lambda KC4 Version #2.7 Rev#9
Reaktionsgefäßschüttler	Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf
Rotationsinkubator	Reax 2, Fa. Heidolph
Röntgenfilmentwickler	Optimax, Fa. Protec Medizintechnik
Semidry-Blotter	Fastblot B44, Fa. Biometra
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel Twin, Fa. Biometra Vertikal-Gelapparatur, 16 x 22 cm, von Fa. Keutz Labortechnik
Schüttler	IKA-Vibrax VXR, Fa. Jahnke und Kunkel
Schüttelinkubator	TH 30, Fa. Edmund Bühler
Spiegelreflexkamera	F70, Fa. Nikon
Stereolupe	SZX 12, Fa. Olympus
Sterilbank	RSB6, Fa. Gelair Flow Laboratories
Thermocycler	Tpersonal, Fa. Biometra T3 Thermocycler, Fa. Biometra
Tischzentrifugen	5415 D und 5415 C, beides Fa. Eppendorf
Ultraschallstab	Sonoplus
Ultrazentrifuge	Optima LE 80K mit Rotoren SW 28 und Typ 70.1Ti, Fa. Beckman
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 1800, Fa. Stratagene
Vortexer	Reax 2000, Fa. Omnilab
Wasserbäder	Fa. GFL und Fa. Julabo
Zellzählkammer	Neubauer, Fa. Brandt
Zentrifugen	J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA- 20, Fa. Beckman GS-6R, FA. Beckman Avanti J-25 mit Rotor JA-25.50, Fa. Beckman- Coulter
Zentrifugenbecher	500ml, Fa. Nalgene
Zentrifugenröhrchen	30ml, Fa. Nalgene

## 4.2 Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Gibco
Agarose (Electrophoresis grade)	Gibco
Agarose (Sea Plaque)	Gibco
Ammoniumacetat	AppliChem
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
ATP	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Hefeextrakt	Gibco
Bacto-Tryptone	Gibco
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva
Calciumchlorid	Merck
Carboxymethylzellulose	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	Appllichem
EDTA (N,N;N',N'-Ethyldiamintetraacetat)	Merck
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Serva
Glycylglycin	Sigma
Glycin	AppliChem
Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Isopropanol	J.T. Baker
Kaliumchlorid	Merck

Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Magermilchpulver	Serva
Methanol	J.T.Baker
MOPS (3-(N-Morpholin)	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumfluorid	Merck
Natriumvanadat	Merck
Nonidet-P-40 (NP-40)	Sigma
ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)	Sigma
PBS (phosphate buffered saline)	Gibco
Pefabloc	Boehringer
Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC)	Pharmacia
Polyethylenglycol 8000 (PEG-8000)	Sigma
Roti-Blue	Roth
Rotiphenol/Chloroform	Roth
RPMI 1640	Gibco
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel-de- Häen
Spermidin	Sigma
Spermin	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
TLCK (N-p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon)	Sigma
TPCK (N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethylketon)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Tryptose phosphate broth	Gibco

Tween 20	Serva
X-gal (5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-Galactosid	Sigma
Xylencyanol	Merck

#### 4.3. Verwendete Plasmide

Für die Klonierung und Expressionsstudien wurden nachfolgend aufgeführte Plasmide verwendet.

<b>p-Bluescript-KS I:</b>	Klonierungsvektor mit MCS („multiple cloning site“), Ampicillinresistenzgen und „blau-weiß“ Selektionsmöglichkeit (Fa. Stratagene)
<b>pGEM-T-Vektor:</b>	Vektor zur Klonierung von PCR Fragmenten. Der Vektor ist linearisiert. Er enthält überhängende 3'-Thymidinnukleotide zur effizienten Klonierung von Fragmenten, die überhängende Adennukleotide aufweisen (Fa. Promega).
<b>pcDNA3.1:</b>	Expressionsplasmid (Fa. Invitrogen), das unter Kontrolle eines CMV-Promotors Proteine erzeugt
<b>pcDNA4/TO/myc-His C:</b>	Expressionsplasmid (Fa. Invitrogen), das unter Kontrolle eines CMV-Promotors ein Fusionsprotein mit c-terminalem c-myc- und 6xHis-Epitope erzeugt; CMV-Promotor durch 2 Tetracyclin-Operatorsequenzen (TetO <sub>2</sub> ) induzierbar; vermittelt Zeocin-Resistenz durch Expression des Bleomycin-Gens aus <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
<b>pCMV<math>\beta</math>-Gal:</b>	pCMV $\beta$ (Clontech) ist ein eukaryontischer Expressionsvektor, der die $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors exprimiert. Die gemessene $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde dann zum Abgleich der Transfektionseffizienzen verwendet
<b>pcDNA3.1-HCVcore:</b>	Das Hepatitis C Virus Core Protein wurde aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 generiert.

Die DNA Sequenz des Core Proteins wurde über *HindIII* und *XhoI* eingefügt.

**pcDNA3.1-HCVE1/E2:** Das Hepatitis C Virus E1 und E2 Protein wurde aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 generiert. Die DNA Sequenz der Proteine wurde über *HindIII* und *EcoRI* eingefügt. Am 3'-Ende der Sequenz wurde ein Stop-Codon angehängt.

**pHBV1.28-wt:** Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen replikationskompetenten HBV-Vektor. Das Plasmid und die Vektoren mit Mutationsplasmide wurden von Dr. Frank Tacke und Dr. Thomas Bock zur Verfügung gestellt und sind im Ergebnisteil (Kapitel 5.1) näher beschrieben. Alle Konstrukte basieren auf dem Standardklonierungsvektor p-Blueskript®II KS-(+) der Fa. Stratagene und enthalten das 1.28fache HBV-Genom des Subtyps adw2. Das Plasmid pHBV1.28-wt kodiert für den HBV-Wildtyp.

**pHBV1.5:** Das Konstrukt basiert ebenfalls auf dem Standardklonierungsvektor p-Blueskript®II KS-(+) der Fa. Stratagene und enthält das 1.5fache HBV-Genom des Subtyps adw2.

## **4.4 Zellbiologische Methoden**

### **4.4.1 Verwendete Zelllinie**

HuH-7: Die humane Hepatomzelllinie HuH-7 (NAKABAJASHI et al, 1984) wurde zur Transfektion von Expressionsplasmiden benutzt.



#### 4.4.2 Allgemeine Zellkulturverfahren

Folgende spezifische Verbrauchsmaterialien kamen zum Einsatz:

Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S.02, Fa. Sarstedt
Einwegspritzen	Injekt/Luer 5 ml, 10 ml, 20 ml, Fa. Braun
Filtrationssysteme	Steriflip, 25 ml, 0,22 µm, Fa. Millipore Stericup, 150 ml, 0,22 µm, Fa. Millipore
Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup> , Filterdeckel, Fa. Nunc
Zellkulturschalen	6 cm Durchmesser, Fa. Greiner

Folgende Medien, Puffer und Zusätze wurden allgemein für die Zellkultur benötigt:

**Dulbecco's MEM mit Glutamax-I** (enthält L-Alanyl-L-Glutamine, Natriumpyruvat, 4,5 g/L Glucose und Pyridoxine), Fa. Invitrogen

**10x PBS** (w/o Calcium und Magnesium), Fa. Invitrogen: Die Verdünnung mit dest. H<sub>2</sub>O ergab eine 1x Gebrauchslösung, die durch Autoklavierung keimfrei gemacht wurde.

**100x Penicillin/Streptomycin** (10.000 units; 10mg/ml), Fa. PAA

**Dimethylsulfoxid (DMSO)**, Fa. Sigma

**Fungizone**, Antimykotikum, 250µg/ml Amphotericin, Fa. Invitrogen

**Foetales Rinderserum (FCS)**, Lot: 40F1500K, Fa. Invitrogen

**10x Trypsin/EDTA-Lösung** (in 10x PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), Fa. Biochrom: Durch Verdünnen mit PBS wurde eine 1x Gebrauchslösung hergestellt und steril filtriert.

##### **Zellkulturmedium:**

<u>500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I</u>	<u>Endkonzentration</u>
50 ml FCS	10% (v/v)
10 ml 100x Penicillin/Streptomycin	0,1 mg/ml
350µl Fungizone	0,175 µg/ml

HuH-7 Zellen wurden in 250 ml Gewebekulturflaschen mit 10 ml Zellkulturmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz des Zellrasens wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Hierzu wurden HuH-7 kurz in 1 x Trypsinlösung geschwenkt und für 4 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen von der Flaschenwand und

Resuspension in DMEM-Medium wurden die Hepatoma-Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 in 250 ml Kulturfラスchen ausgesät.

### 4.4.3 Methoden zur Transfektion somatischer Zellen

#### 4.4.3.1 Transfektion nach CHEN und OKAYAMA (1987)

Die von Chen und Okayama entwickelte Methode zur transienten Transfektion basiert auf der endozytotischen Aufnahme von DNA-Calciumphosphat-Kopräzipitaten durch eukaryontische Zellen unter Schockbedingungen.

HuH-7 Zellen wurden am Tag vor der Transfektion bzw. 5 Tage vor der Transfektion in 6 cm Zellkulturschalen in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  bzw.  $1,3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Pro Kulturschale wurden 3 ml Zellsuspension eingesetzt. Zur Transfektion wurden 5 µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde zunächst mit 150 µl 0,25 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung vermischt, anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl 2 x BBS-Puffer, pH 6,9. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Ausbildung der DNA-Calciumphosphat-Präzipitate inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde unter leichtem Schwenken der Kulturschale auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 16 Stunden unter Schockbedingungen (35°C und 3 %  $\text{CO}_2$ ) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und der Zugabe von frischem DMEM-Medium wurden die Zellen bis zur Ernte bei den jeweils angegebenen Zeitpunkten unter normalen Zellkulturbedingungen gehalten.

**0,25 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung:** 1,84 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  wurden frisch in 50 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

<b>2x BBS-Puffer, pH 6,9:</b> (add100ml)	Endkonzentration
1,64 g NaCl	280 mM NaCl
1,07 g BES (Fa. Sigma)	50 mM BES
0,03 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

#### **4.4.3.2 Transfektion mit PolyFect Transfection Reagent (Fa. Qiagen)**

Um eine erhöhte Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden humane Zellen mit *PolyFect Transfection Reagent* transfiziert. Durch rezeptorvermittelten Endozytose (transmembrane Asialoglykoproteine) gelangen die PolyFect-DNA-Komplexe als Endosomen in die Zelle und werden in den Kern transportiert.

Die HuH-7 Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6 cm Schalen mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. 30 – 60 Minuten vor Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Zur Transfektion wurden pro Flasche 2,5 µg DNA mit 150 µl Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (ohne Zusätze) verdünnt und anschließend mit 15 µl PolyFect Reagent versetzt. Zur Bildung der PolyFect-DNA-Komplexe folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, an deren Ende 1 ml Zellkulturmedium mit den PolyFect-DNA-Komplexen vermischt wurde. Das Zellkulturmedium der HuH-7 Zellen wurde mit dieser Suspension supplementiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen geerntet.

#### **4.4.4 β-Galactosidase-Assay**

Der β-Galactosidase-Expressionsvektor dient aufgrund der starken, vom CMV-Promoter abhängigen Expression des β-Galactosidase-Gens als Kontrolle der Transfektionseffizienz und somit als Korrekturgröße für durch Transfektionsexperimente gewonnene Ergebnisse. Die Aktivität der β-Galactosidase kann in Zellextrakten mit geeigneten Substraten in einer Farbreaktion spektrophotometrisch quantifiziert werden. Im Allgemeinen wurden pro Transfektionsansatz von 5 µg DNA je nach beabsichtigter Expressionsdauer bzw. Zelltyp 0,3 – 1 µg β-Galactosidasevektor zugesetzt. Der Anteil wurde dahingehend optimiert, dass die Reaktionszeit mindestens 15 Minuten betrug, aber möglichst 1 Stunde nicht überschritt. Transfizierte Zellen wurden 18 – 24 Stunden nach Mediumwechsel zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 350 µl 1 x Extraktionspuffer 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysats abgeschabt und 5 Minuten in der Tischzentrifuge bei 14000 rpm

abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätsmessung auf Eis gelagert. 10  $\mu$ l der Zellextrakte wurden mit 100  $\mu$ l Assaypuffer bis zu einer leichten Gelbfärbung bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 50  $\mu$ l 1 M Natriumcarbonat wurde der Ansatz noch etwa 30 Minuten im Dunkeln aufbewahrt und im Anschluss die Färbung bei 405 nm im Photometer gegen einen Leerwert gemessen. Der lineare Bereich reicht von 0,2 bis 0,8 OD<sub>405</sub>.

<b>5x Extraktions-Puffer:</b> (add 100ml)	Endkonzentration
12,5 ml 1M Tris/phosphat (pH 7,8 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	125 mM Tris/phosphat, pH 7,8
2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	10 mM EDTA, pH 8,0
50 ml 100% Glycerol	50 % Glycerol
5 ml Triton X- 100 (Fa. Sigma)	5% Triton-X100
frisch zufügen:	
2 $\mu$ l/ml 1 M DTT-Lösung	2 mM DTT

<b>Assaypuffer:</b> (add 1 Liter)	Endkonzentration
10,7 g Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5,4 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	39 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 ml 1 M KCl-Lösung	10 mM KCl
1 ml 1M MgSO <sub>4</sub> -Lösung	1 mM MgSO <sub>4</sub>
frisch zufügen:	
2 $\mu$ l/ml 1 M DTT-Lösung	2 mM DTT
1 mg/ml ONPG (Fa. Sigma)	

**1 M KCl-Lösung:** 7,65 g KCl (Fa. Merck) in 100 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen.

**1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung:** 24,7 g MgSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck) in 100 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen.

**1 M Natriumcarbonat-Lösung:** 106 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 1 Liter dest. H<sub>2</sub>O lösen.

## **4.5 Tierexperimentelle Methoden**

### **4.5.1 Verwendete Mausstämme**

In der vorliegenden Arbeit wurden adulte Tiere der Inzuchtlinie **FVB/N** zur Gewinnung von Nukleinsäure- und Proteinextrakten verwendet. Alle Mäuse wurden aus Zuchten des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen.

### **4.5.2 Injektion der Plasmid-DNA**

Die Injektion der linearisierten Plasmide (siehe 4.3) erfolgte intravenös durch hydrodynamische Transfektion. Die Tiere wurden für die Injektion in eine Arretiervorrichtung (Plexiglasröhre) geführt. Der Schwanz der Mäuse wurde mit warmem Wasser erwärmt. Das Plasmid wurde mit 1,8 ml 0,9 % NaCl (Fa. Merck) durch eine Kanüle möglichst großen Durchmessers in eine der vier Schwanzvenen injiziert, wobei die Injektionszeit ungefähr 5 Sekunden betrug. Kontrolltieren wurde ein entsprechendes Volumen 0,9 % NaCl, bzw. Kontrollvektoren injiziert.

### **4.5.3 Retroorbitale Blutentnahme**

Die Blutabnahme erfolgte am betäubten Tier. Die Tiere werden ca. 30 Sekunden einer Etheratmosphäre ausgesetzt. Mit einer Glaskanüle wurde die Vene vor dem rechten Auge perforiert und eine möglichst geringe Menge Blut entnommen.

### **4.5.4 Gewinnung von Serum aus Blut**

Die Blutproben wurden bei 4000 rpm für 20 Minuten und 4°C zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und 50 µl für die Messung von HBsAg und HBeAg verwendet. Die Serummenge wurde auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt.

#### 4.5.5 Tiertötung und Gewebeentnahmen

Die Tiertötung erfolgte am betäubten Tier. Alle Tiere wurden durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Die entsprechenden Gewebe wurden entnommen und in 4°C kaltem PBS zwischengelagert (für Kernproteinextraktionen), oder in flüssigen Stickstoff gefroren (für RNA Biopsien und die Anfertigung von Kryoschnitten).

### 4.6 Mikrobielle Arbeitsmethoden

#### 4.6.1 Verwendete Bakterienstämme

Chemisch-kompetente Zellen des *Escherichia coli*-Stammes **TOP10F'** (One Shot® TOP10F', Fa. Invitrogen), die eine Transformationseffizienz von mehr als  $1 \times 10^9$  Transformanten pro  $\mu\text{g}$  pUC18-DNA aufwiesen, dienten zur Subtransformation in den pGEM-T-Vektor und zur Retransformation. TOP10F' Zellen enthalten ein F' Episome, das ein Tetracyclinresistenzgen, einen  $\text{lacI}^q$ -Repressor und einen f1 Replikationsstart umfasst.

Ultrakompetente *Escherichia coli*-Zellen des Stammes **XL10-Gold** (Fa. Stratagene) wurden zur chemischen Transformation von Plasmiden eingesetzt. XL10-Gold Zellen bilden mindestens  $5 \times 10^9$  Kolonien pro  $\mu\text{g}$  pUC18-DNA.

Genotypen der benutzten *Escherichia coli*-Stämme:

<b>TOP10F'</b>	$\text{F}'\{\text{lacI}^q, \text{Tn10}(\text{Tet}^R)\}$ <i>mcrA</i> $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ $\Delta\text{lacX74}$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(\text{ara-leu})7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
<b>XL10-Gold</b>	$\text{Tet}^r\Delta(\text{mcrA})183$ $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$ <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lacHte</i> [ $\text{F}'$ <i>proAb</i> $\text{lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15}$ <i>Tn</i> ( $\text{Tet}^r$ ) <i>Amy</i> <i>Cam</i> <sup>r</sup> ] <sup>a</sup>

#### 4.6.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Vermehrung von *Escherichia coli* wurde LB-Medium als flüssige Nährlösung und LB-Agarplatten verwendet.

**LB-Medium:** 10 g Select Peptone 140,5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden auf 1000 ml mit dest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt und autoklaviert. Unmittelbar vor Inkulturnahme der Bakterien erfolgt die Zugabe von 2 µl Ampicillin-Lösung pro ml Medium (100 mg Ampicillin-Natrium/ml) zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml.

**LB-Agarplatten:** 1 Liter LB-Medium wurde mit 1 g Select Agar versetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidpositiver Klone wurde 2 µl/ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml Ampicillin-Natrium) nach Abkühlung auf unter 60°C zugefügt, so dass eine Endkonzentration von 0,2 mg/ml Antibiotikum entstand. Nach dem Ausgießen in Petrischalen und dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### 4.6.3 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

50 µl chemisch-kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl eines Ligationsansatzes vermischt. Der Transformationsansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 42°C für ca. 30 Sekunden ausgesetzt und für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 200 µl SOC-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C im Thermoschüttler regeneriert. Jeweils ca. 150 µl des Transformationsansatzes wurde auf einer Agarplatte, welche 2 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgestrichen. Die Agarplatten wurden umgedreht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

**SOC-Medium:** 10 ml SOB-Medium wurden mit 100 µl Mg<sup>2+</sup>-Lösung und 100 µl 2M Glucose-Lösung supplementiert.

**SOB-Medium:** 20 g Select Peptone 140 (Fa. Gibco), 5 g Hefeextrakt (Fa. Roth), 0,6 g NaCl (Fa. Merck) und 0,19 g KCl (Fa. Applchem) wurden in 1 Liter dest. H<sub>2</sub>O gelöst und pH 7,5 eingestellt.

**Mg<sup>2+</sup>-Lösung:** 50 % 2M Magnesiumchlorid-Lösung (20,3 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, Fa. Appli-Chem) in 50 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst wurden mit 50 % 2M Magnesiumsulfat-Lösung (24,7 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck) in 50 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst) gemischt und steril filtriert.

**2M Glucose-Lösung:** 54,06 g D-(+)-Glucose (Fa. Sigma) in 100 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und steril filtrieren.

Um nach T/A-Ligationsreaktion (siehe 4.7.7.1) und Transformation in TOP10F'-Zellen eine Unterscheidung zwischen Bakterienkolonien mit nur religiertem Plasmid und Bakterienkolonien mit Insertion im Plasmid zu erleichtern, wurde das Verfahren der **Blau-Weiß-Selektion** angewandt. Hierzu wurden zusätzlich folgende Lösungen benötigt:

**40mg/ml X-Gal-Lösung:** 400 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (X-Gal, Fa. Sigma) wurden in 10 ml Dimethylformamid (Fa. ICN Biomedicals) gelöst und bei -20°C gelagert.

**100 mM IPTG-Lösung:** 238 mg Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG, Fa. Promega) wurden in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst, zu je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Da TOP10F' Zellen einen Lac-Repressor überexprimieren, mußten die Agarplatten zur Blau-Weiß-Selektion außer mit 40 ml X-Gal-Lösung noch zusätzlich mit 40 ml IPTG vorbehandelt werden. IPTG verdrängte als allosterischer Inhibitor den Lac-Repressor vom Lac-Promotor des Plasmids, der das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen steuert. Unter Anwesenheit von IPTG konnte die vom Plasmid kodierte  $\beta$ -Galaktosidase erzeugt werden, die dann X-Gal in ein blaues Indigoderivat umsetzte. Es blieben nur die Bakterienkolonien weiß, in deren Plasmid eine Insertion die Transkription des  $\beta$ -Galaktosidase-Gen unter-bunden hatte (lacZ-Mutanten).

## 4.7 Allgemeine Arbeitsmethoden zur Untersuchung von Nukleinsäuren

### 4.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### 4.7.1.1 Analytische Präparation hochreiner Plasmid-DNA

Diese DNA-Präparationsmethode ist dazu geeignet, mit dem isolierten DNA-Material



auch Sequenzanalysen durchführen zu können. Die DNA wurde aus kleinen Bakterienkulturen (4 ml) mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) isoliert, wobei die Herstellerangaben strikt befolgt wurden. Eine Analyse von Integrität und gegebenenfalls Insertgröße des Plasmides fand durch Restriktionshydrolyse und Agarosegelelektrophorese der entstehenden DNA Fragmente statt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

### **4.7.1.2 Präparative Plasmidpräparation (Maxi-Präparation)**

Präparative Plasmidpräparationen wurden mit dem Plasmid Maxi Kit sowie dem EndoFree Buffer Set der Firma Qiagen nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers zur endotoxinfreien DNA-Präparation durchgeführt. Die Verwendung endotoxinfreier DNA erhöht bei Transfektionsexperimenten die Effizienz des Transfers. Die Ausbeute an Plasmid-DNA aus einer 250 ml Übernachtskultur liegt bei diesen Aufarbeitungsmethoden zwischen 100 – 500 µg. Eine Analyse von Integrität und gegebenenfalls Insertionsgröße des Plasmides fand durch Restriktionshydrolyse und Agarosegelelektrophorese der entstehenden DNA Fragmente statt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

### **4.7.2 Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen**

Für die Isolierung von RNA wird ein Gewebestück (ca. 50 – 100 mg) in der peqGOLD RNAPure™-Lösung (Fa. Peqlab) (1 ml pro 50 mg Gewebe) durch einen Glas-Teflon Homogenisator homogenisiert. Zu 1 ml des Homogenats wurden anschließend 0,2 ml Chloroform gegeben. Die Proben wurden für 15 Sekunden geschüttelt und für 3 – 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 x g und 4°C führte zu einer Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert. Diese Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetzten Milliliter peqGOLD RNAPure™-Lösung. Die Proben wurden für 5 – 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde für 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde für ca. 10 Minuten an der Luft getrocknet und die RNA anschließend in RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte wie in 4.7.4 beschrieben.

### **4.7.3           Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren**

#### **4.7.3.1       Natriumacetat-Ethanol-Fällung**

Die DNA wurde aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 sowie 2 Volumina 100 %igem Ethanol gefällt, wobei die Präzipitation für mindestens 30 Minuten bei -20°C erfolgte. Bei geringen DNA-Mengen wurde 1 µg Glycogen als Präzipitationshilfe zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 20 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die pelletierte DNA mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15000 x g, 4°C, 10 Minuten). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet ca. 10 – 15 Minuten getrocknet und in dest. H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **4.7.3.2       Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Aufreinigung**

Zur Entfernung von Proteinen aus DNA-haltigen Reaktionsansätzen wurden die entsprechenden Proben phenolisiert und die DNA anschließend präzipitiert. Zu diesem Zweck wurden die wässrigen DNA-Proben mit dem gleichen Volumen Roti-Phenol (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Fa. Roth) versetzt, gründlich durchmischt und zur Phasentrennung 2 Minuten bei 15000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen. Die DNA in der letzten wässrigen Phase wurde mit Ethanol präzipitiert.

#### **4.7.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm in UV-Platten (UV 96 Well Flat Bottom, Fa. Costar) im Photometer Lambda Scan 200e (Fa. MWG Biotech) gemessen. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1,0<sub>(260nm)</sub> ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung konnte bei zusätzlicher Messung der Extinktion bei 280 nm getroffen werden. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  liegt bei geringen Verunreinigungen von DNA bei 1,7 – 1,9 und für RNA zwischen 1,9 – 2,1.

#### **4.7.5 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gewählt. Die zu hydrolysierende DNA wurde mit mindestens 3 units Enzym/µg DNA mindestens 1 Stunde behandelt.

#### **4.7.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung wurde die DNA in einem Ethidiumbromid enthaltendem Agarosegel aufgetrennt, und die betreffende Bande ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen). Eine Analyse auf Integrität und Quantität der extrahierten Fragmente fand durch Agarosegelelektrophorese statt (4.7.8). Die DNA-Fragmente wurden bei -20°C gelagert.

#### **4.7.7 Ligation von DNA**

Die Ligationstechnik dient der Verknüpfung homolog-kohäsiver (sticky ends) bzw. stumpfer Enden (blunt ends) von DNA-Fragmenten. Die zu diesem Zweck verwendete DNA-Ligase ist in eukaryontischen Zellen ein wichtiges Reparaturenzym

für aufgebrochene Phosphodiesterbindungen in der DNA. Bei Klonierungsexperimenten kann diese Eigenschaft des Enzyms dazu genutzt werden, DNA-Moleküle in vitro miteinander zu verknüpfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Ligationen mit T4-DNA-Ligase und dem zugehörigen Puffer der Fa. NEB unter Zusatz von 1 µl 10mM ATP (Fa. Sigma) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl angesetzt. Die Ligation kohäsiver Enden erfolgte unter Zusatz von 200 Weiss-U T4-DNA-Ligase durch eine mindestens dreistündige Inkubation bei 16°C. Bei kohäsiven Ligationen wurden der linearisierte Vektor und das zu ligierende Insert in einem molaren Verhältnis von 1:4 eingesetzt, wobei eine DNA-Gesamtmenge von 500 ng bei kohäsiven Ligationen angestrebt wurde.

### **4.7.7.1 T/A-Klonierung**

PCR-Produkte weisen 3'-Adenosin-Überhänge auf, die direkt an modifizierte Thymidin-Überhänge linearisierter Vektoren ligiert werden können (T/A-Klonierung). Im Rahmen dieser Dissertation wurde dazu der TOPO T/A Cloning Kit (Fa. Invitrogen) verwendet, der das modifizierte Plasmid pCR 2.1 enthält. Zur Klonierung wurden 4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) und 1 µl Plasmidsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Für PCR-Produkte mit einer Größe bis 500 bp wurde für 5 Minuten inkubiert, während für größere PCR-Produkte die Inkubationszeit bis auf 30 Minuten verlängert wurde.

### **4.7.8 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäurefragmenten. Da sich diese aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld gerichtet bewegen, lassen sie sich mit Hilfe einer Agarose-Gelmatrix ihrer Größe entsprechend auftrennen. Durch Ethidiumbromidfärbung können Nukleinsäurefragmente visualisiert werden, da Ethidiumbromid die DNA interkaliert. Bei Betrachtung unter UV-Licht (254 nm oder 366 nm) fluoresziert das Ethidiumbromid intensiv orange. Sowohl für analytische als auch für präparative Agarosegelelektrophoresen wurden 0,8 – 1,5 %ige Gele (Electrophoresis Grade

Agarose, Fa. Invitrogen) in TAE-Puffer mit 0,0001 Vol. Ethidiumbromid (10 mg/ml, Fa. Sigma) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 0,2 Volumen 5 x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm mit TAE als Laufpuffer. Als DNA-Größenstandard wurde die 1 KB Plus DNA-Leiter (Fa. Gibco) eingesetzt.

### **4.8 Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen**

#### **4.8.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Sequenzen aus einer Vielfalt von Nukleinsäuren nutzt man die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR ist ein in-vitro-Verfahren, bei dem mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotid-Primer, die die terminalen Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz komplementär flankieren, und der thermostabilen *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*) eine exponentielle selektive Amplifikation erreicht wird.

Das Prinzip der PCR besteht aus einer sich mehrfach wiederholenden Reaktion aus drei verschiedenen Schritten: **I.** Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen DNA **II.** Annealing der Oligonukleotid-Primer und **III.** Extension der Amplifikate durch *Taq*-Polymerase. In der vorliegenden Arbeit wurde das BD Advantage™2 PCR Kit (Fa. BD Biosciences) und dNTP Mix (Fa. Invitrogen) verwendet.

<b>Reaktionslösung</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
DNA-Template	x µl	50 – 100 ng
10x BD PCR-Puffer	5 µl	
Primer 1 (10 pmol)	2 µl	20 pmol
Primer 2 (10 pmol)	2 µl	20 pmol
dNTP-Mix (2,5 mM)	4 µl	10 mM
50x BD Polymerase Mix	1 µl	
DEPC-H <sub>2</sub> O	x µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern  $\leq 20\text{bp}$  erfolgte nach der Formel

$$T_M = 2^\circ\text{C} \times n(\text{AT}) + 4^\circ\text{C} \times n(\text{GC})$$

Primer  $\geq 20\text{bp}$  wurden nach  $T_M = 59,8^\circ\text{C} + 0,41 (\%GC) - 675/n$

(n = Anzahl der Basenpaare)

Folgendes Standardprogramm wurde für die jeweilige Primerkonstellation und DNA-Matrize modifiziert:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Sprung	Zyklen
1. Denaturierung	95°C	3 Minuten		
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden		
3. Annealing	$T_M - 5^\circ\text{C}$	15 –30 Sekunden		
4. Elongation	68°C	1 Minute/kB	2.	25 – 35
5. Konservierung	4°C	Pause		

#### 4.8.1.1 Verwendete Oligonukleotide

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit als Primer für PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide in Bezug auf ihre speziellen Anwendungen aufgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind jeweils in 5'-3'-Richtung angegeben:

Primername	Sequenz
<b>GAPDH-1</b>	GAC AGT CAG CCG CAT CTT CTT TTG
<b>GAPDH-2</b>	TGC TGA TGA TCT TGA GGC TGT TGT
<b>HBV-S1</b>	GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC TTG
<b>HBV-S2</b>	GCA TGG TCC CGT ACT GGT TGT TGT
<b>preC-mut-anti</b>	CTA AGG CTT CTC GAT ACA GAG C
<b>praeC-Fspl</b>	TGG TCT GCG CAC CAG CAC CAT GCA ACT TTT TCA CCT
<b>GAPDH 1 (Maus)</b>	ACG GCA AAT TCA ACG GCA CAG TCA
<b>GAPDH 2 (Maus)</b>	CAT TGG GGG TAG GAA CAC GGA AGG
<b>Core-seq-s</b>	GGT GGT CAG ATC GTT GGT GGA GTT

<b>Core-seq-as2</b>	GAA GCC GCA TGT AAG GGT ATC G
<b>HindIII-HCV core s</b>	TAA AGC TTC CTG ATA GGG TGC TTG CGA GTG CCC C
<b>XhoI-core-as</b>	AAC TCG AGA GCA ACG GGA GAA ATT ACT CTC CCG G
<b>E1 sense</b>	ATA AGC TTT ACC AAG TGC GCA ATT CCT CGG
<b>E2as</b>	ATG AAT TCC TAC GCC TCC GCT TGG GAT ATG AGT

---

#### 4.8.2 Reverse Transkription (RT) und RT-PCR

*In vitro* kann reife mRNA als Matrize für die Herstellung einer genauen DNA-Kopie – copy DNA oder cDNA genannt – dienen. Das Enzym Reverse Transkriptase, eine in Retroviren identifizierte RNA-abhängigen DNA-Polymerase, synthetisiert dabei eine identische DNA-Kopie der RNA (TAYLOR, ILLMENSEE und SUMMERS, 1976; BERCHTHOLD, 1989). Dieses Verfahren der Reversen Transkription kann in Verbindung mit der PCR zur Analyse der Expression spezifischer Gene eingesetzt werden. cDNAs dienen zudem der Erzeugung rekombinanter Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde die SuperScript™II Reverse Transcriptase (Fa. Invitrogen), dNTP Mix (Fa. Invitrogen) mit Oligo-dT 15 Primer (Fa. Promega) benutzt. Durch die Verwendung von Oligo-dT-Primern, die sich an die 3' terminale Poly(A)-Sequenz der reifen mRNA anlagern, wurde die Kopierung der vollständigen mRNA gewährleistet. Folgendes Reaktionsgemisch wurde hergestellt:

<b>Reaktionslösung</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Gesamt-RNA	x µl	1 ng – 5 µg
Oligo-dT 15 Primer (500 µg/ml)	1 µl	0,5 µg
dNTP-Mix (2,5 mM)	4 µl	10 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	x µl	
Gesamtvolumen	12 µl	

Diese Reaktionslösung wird für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und schnell auf 4°C abgekühlt. Dann wird folgendes hinzugefügt:

Reaktionslösung	Volumen	Endkonzentration
5 x First-Strand Buffer	4 µl	
DTT (0,1 M)	2 µl	0,2 M
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 µl	

Nach Zugabe dieser Reaktionslösung wird das Gemisch für 2 Minuten auf 42°C erhitzt und dann 1 µl (200 units) SuperScript™II RT hinzugefügt. Anschließend wird die Inkubation bei 42°C für weitere 48 Minuten fortgesetzt. Die Reaktion wird bei 70°C für 15 Minuten inaktiviert und darauf folgend bei 4°C konserviert. Folgte außerdem eine PCR-Reaktion mit den synthetisierten cDNAs als *template*, spricht man von einer Zweischnitt-RT-PCR. Durch PCR mit spezifischen Primern für die cDNA des ubiquitär exprimierten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Gens aus der Glykolyse wurde zuerst die Integrität des cDNA-Gemisches nachgewiesen (*housekeeping-Gen*). Zugleich diente das GAPDH-Quantifizierung der Bestätigung äquivalenter Gesamt-RNA-Mengen in der RT-Reaktion und somit als Abgleich für die folgenden PCR-Experimente.

### 4.8.3 Northern Blot

Durch die Northern Blot Analyse kann sowohl qualitativ, als auch quantitativ die Expression einer spezifischen mRNA Population untersucht werden. Die zu analysierende RNA wird in einem denaturierenden Agarosegel entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. anschließend wird sie auf eine geeignete Trägermembran transferiert. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, der RNA Sequenz komplementären DNA und der anschließenden Autoradiographie, wird die Visualisierung und Quantifizierung des zu analysierenden Gens ermöglicht.

#### 4.8.3.1 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA wird in einem 1%igem Agarose/1 x MOPS/0,22 M Formaldehyd-Gel in 1 x MOPS/0,22 M Formaldehyd-Laufpuffer bei 100 – 150 Volt elektrophoretisch



aufgetrennt. Der RNA-Ansatz wird vor dem Beladen des Gels mit 1/5 Volumen RNA-Ladepuffer versetzt und 10 Minuten bei 95°C denaturiert.

### **10 x MOPS-Puffer, pH 7, ad 1000 ml:**

41,8 g	MOPS (0,2 M)
6,8 g	Natriumacetat (50 mM)
2 ml	0,5 M EDTA, pH 8 (0,01 M)

### **5 x Ladepuffer, ad 10 ml:**

16 µl	Bromophenol-Blue-Lsg.
80 µl	0,5 M EDTA, pH 8
100 µl	EtBr (Stock 10 mg/ml)
720 µl	37 % Formaldehyd
2000 µl	100 % Glycerol
3084 µl	Formamid
4000 µl	10 x MOPS

Die im Agarose Gel aufgetrennte RNA wird auf eine Membran transferiert. Der Aufbau der Semi-Dry-Blotapparatur erfolgte dann wie folgt beschrieben:

Zwei Streifen Filterpapiere (Chromatography Paper 17 CHR, Fa. Whatman), die die Breite des zu blottenden Gels hatten, wurden mit 2 x SSC befeuchtet und auf eine Glasplatte gelegt. Das Gel auf diese Filterpapiere wurde umgedreht gelegt und mit einer passenden Nylonmembran (Hybond-N+, Fa. Amersham Bioscience), ebenfalls mit 2 x SSC angefeuchtet, bedeckt. Auf die Membran folgten zwei mit 2 x SSC befeuchtete Filterpapiere, zwei trockene Filterpapiere und saugfähiger Zellstoff (Nowozell natur, 4-lagig), eine Glasplatte und ein Gewicht zur Beschwerung. Durch die Kapillarwirkung des Zellstoffs wurden mit dem 2 x SSC auch die RNA-Fragmente aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran übertragen. Das Blotting fand über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Lage der Geltaschen auf der Membran markiert und diese getrocknet. Anschließend erfolgte das *Crosslinking* der DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (1200 Watt, Stratalinker, Fa. Statagene).

#### 4.8.4 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit $^{32}\text{P}$

Radioaktive Phosphatgruppen wurden mittels Nick-Translation Kit N 5000 (Fa. Amersham Bioscience) in DNA-Sonden von 500 – 1000 bp Größe eingebaut. Das Markierungsprinzip dieses Kits beruht darauf, dass DNase I in zufälliger Abfolge DNA-Doppelstrangbrüche verursacht. Diese Bruchstellen werden von der DNA Polymerase I verschlossen, in dem das Nukleotid am 5' Ende der Bruchstelle entfernt (5'-3'-Exonuklease-Funktion). Der Doppelstrang wird anschließend durch den Einbau freier Nukleotide geschlossen wird (5'-3'-DNA-Polymerase-Funktion) (RIGBY et al, 1977). Da das zugesetzte dCTP  $^{32}\text{P}$  markiert ist entsteht bei dieser Reaktion eine einheitliche Population radioaktiv markierter DNA-Moleküle gleicher Größe.

Pro Reaktionsansatz wurde vom Hersteller empfohlen 50 ng DNA, 5  $\mu\text{l}$  Enzymlösung, 10  $\mu\text{l}$  Nukleotid-Puffer und 5  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ - $\alpha$  dCTP (10  $\mu\text{Ci/ml}$ , Fa. Amersham) mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  einzustellen und die Labelling-Reaktion bei 16°C für 1 Stunde ablaufen zu lassen. Nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0 wurden die überschüssigen Radionukleotide durch Gelfiltration in Resin-Säulen (Microspin S-200 HR Columns, Fa. Amersham Bioscience) von der radioaktiven Sonde abgetrennt.

#### 4.8.5 Hybridisierung mit radioaktiven Sonden

Für radioaktive Hybridisierungen wurden folgende Puffer und Lösungen hergestellt:

<b>Church-Hybridisierungslösung:</b> (add 0,5 Liter)	Endkonzentration
250 ml 1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,0	0,5 M Phosphatpuffer, pH7,2
60 ml 1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 3,8	
1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	1mM EDTA
175 ml 20% SDS	7 %SDS

**1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung:** 69 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Fa. Merck) wurden in 500 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und der pH 3,8 mit 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Fa. Merck) eingestellt.

**1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung:** 89 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Fa. Merck) und pH 9,0 mit 1 M NaOH eingestellt.

<b>5x SSC, 0,1% SDS:</b> (add 1 Liter)	Endkonzentration
250 ml 20x SSC	5x SSC
5 ml 20 % SDS	0,1 % SDS
<hr/>	
<b>2x SSC, 0,1% SDS:</b> (add 1 Liter)	Endkonzentration
100 ml 20x SSC	2x SSC
5 ml 20 % SDS	0,1 % SDS
<hr/>	
<b>0,1x SSC, 0,1% SDS:</b> (add 1 Liter)	Endkonzentration
5 ml 20x SSC	0,1x SSC
5 ml 20 % SDS	0,1 % SDS

Die zu markierende Northern-Membran wurde mit 2 x SSC angefeuchtet und an die innere Wand einer Hybridisierungsflasche gelegt, in die dann 8 ml 65°C warme Church-Hybridisierungslösung pipettiert wurden. Diese Prähybridisierung erfolgt für mindestens 1 Stunde. Die radioaktive DNA-Sonde wurde durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten und durch Abschrecken auf Eis denaturiert und mit der Hybridisierungslösung auf eine Aktivität von 0,5 – 2 Mio. cpm verdünnt. Die Sonde wurde auf die prähybridisierte Membran gegeben und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Um unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurde die Membran bei 55 – 65°C für ungefähr 15 Minuten gewaschen. Die Waschschrte wurden mit Waschlösung (5-fach SSC bis 0,1 fach SSC, 0,1% SDS) unter ansteigender Stringenz durchgeführt. Nach jedem Waschschrte wird die Membran mit dem Handcounter auf verbliebenen Hintergrund kontrolliert. Anschließend wurde die Membran in eine Kunststoffolie eingeschweißt und in eine Expositionskassette überführt, in der die Detektion der radioaktiven Signale auf Röntgenfilm (Hyperfilm, 18 x 24 cm, Fa. Amersham Life Science) bei -80°C erfolgte.

#### **4.8.6 Präparation intrazellulärer Kapsid-DNA**

Für die Analyse der HBV-Replikation wurde HBV-DNA aus den intrazellulär akkumulierten HBV-Kapsiden isoliert. Dafür wurden die Zellen lysiert (siehe 4.9.1) und durch Immunopräzipitation wurde eine Aufreinigung der Kapside erreicht. Hierzu wurde zuerst ein zusätzlicher Reinigungsschritt (Preclearance) durchgeführt. 50 µl Protein A-Agarose wurden zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und jeweils bei 2500 rpm bei 4°C in 1 Minute zentrifugiert sowie der Überstand dekantiert. Die Zugabe von ca. 25 µl PBS ergab eine 50 %ige Protein-Agarose-Suspension, die zu 1mg/ml Proteinlysate zugefügt wurde. Im Rotationsinkubator bei 4°C für 4 Stunden wurden alle Substanzen durch Bindung an die Protein-Agarose entfernt, die im eigentlichen Immunopräzipitationsschritt störend wirken könnten. Bei 2500 rpm, 4°C und 3 Minuten wurden die Protein-Agarose-Komplexe pelletiert. Der gereinigte Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1-2 µl Antikörper (polyclonaler Anti-Hepatitis B Core HBcAg, Fa. DAKO) versetzt und über Nacht bei 4°C im Rotationsinkubator ständig durchmischt, so dass die Bindung des Antikörpers an sein spezifisches Antigen stattfinden konnte. Danach wurde der Protein A-Agarose-Antikörper-Antigen-Komplex durch 3-minütige Zentrifugation bei 4°C und 2500 rpm sedimentiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 1 ml kaltem PBS und anschließender Zentrifugation für 3 Minuten bei 4°C und 2500 rpm. Das gebildete Pellet wurde in 25 µl PBS resuspendiert. Um die zellulären Nukleinsäuren einschließlich der, ins Genom integrierten oder zur Transfektion eingesetzten HBV-DNA, vollständig zu degradieren wurde das resuspendierte Pellet einem DNase und RNase Verdau unterzogen. Replizierte Virus-DNA bleibt dabei erhalten, da sie durch die intakte Kapsid-Hülle vor der Aktivität der Nukleasen geschützt wird. Für den Verdau wurden je 2 – 4 µl DNase (10U/µl) und RNase (0,5µg/µl) dem Zelllysaten zugegeben und ca. 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Nach der Inkubation wurden zu jedem Ansatz 40µl 10 % SDS gegeben und vorsichtig gemischt. Zum Aufschließen der Viruskapside wurden anschließend 6 µl Proteinase K (14mg/ml) zugegeben und für weitere 60 Minuten bei 56°C inkubiert. Durch die Proteinase K wurden gleichzeitig die Nukleasen inaktiviert, so dass die Kapsid-DNA unbeschadet freigesetzt wurde. Im Anschluss an den Proteinase K Verdau wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion die Kapsid-DNA von Protein- und Zellresten befreit. Dazu wurden zu 450µl der Ansätze 450 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-

Gemisches (25/24/1, v/v/v) gegeben, 1 Minute gründlich geschüttelt und für 2 Minuten bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. 400 µl der oberen, wässrigen Phase wurden abgenommen und mit 100 µl 10 M NH<sub>4</sub>OAc versetzt. Durch Zugabe von 1 ml Ethanol wurde die DNA sedimentiert und durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 15000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min, wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst und bei Bedarf bei –20°C gelagert.

### 4.8.6.1 Dot-Blot isolierter Kapsid-DNA

Die *Dot-Blot-Methode* stellt eine schnelle und einfache Möglichkeit dar, Nukleinsäuren oder Proteine auf einer geeigneten Membran zu immobilisieren. Dafür werden Lösungen der Substanzen in einer geeigneten Apparatur durch die Membran gesaugt, wobei die Substanzen an der Membran haften bleiben. Hier wurde die Methode verwendet, um die isolierte Kapsid-DNA auf eine positiv geladenen Nylonmembran (*GeneScreen Plus*<sup>®</sup>, Fa. *NEN*<sup>®</sup>*LifeScience*) zu binden. Dazu wurde die Membran und ein *Whatman* Filterpapier in 10xSSC angefeuchtet und entsprechend den Angaben des Herstellers in eine *Dot-Blot*-Apparatur (*S&S Minifold I*, Fa. *Schleicher & Schuell*) eingespannt. Die Membran wurde dann durch Befüllen der Probenkammern der Apparatur mit 200µl 10xSSC gewaschen. Die DNA-Proben wurden in einem Endvolumen von 100µl in 0,3N NaOH für 10min bei 95°C denaturiert, auf Eis gekühlt und 100µl 20xSSC pH5 zugegeben. Anschließend wurden je 100µl der Proben in zwei Probenkammern der *Dot-Blot*-Apparatur gegeben und durch die Membran gesaugt. Die Probenkammern wurden dann einmal mit 200µl 10xSSC nachgespült und die Membran der Apparatur entnommen und an der Luft getrocknet. Die getrocknete Membran wurde dann im UV-Crosslinker (120000 µJoule) zur kovalenten Bindung der DNA an der Membran mit UV-Licht bestrahlt. Danach erfolgte eine Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten DNA Sonde wie in 4.8.5 beschrieben.

#### 4.8.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenz spezifischer DNA Fragmente wurde mittels Analyse im ABI-Prism™310-Genetic-Analyser durchgeführt. Diese Methode beruht darauf, dass mittels PCR DNA generiert wird, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide enthält. Die Auftrennung der DNA in dem ABI-Prism™-System erfolgt durch Elektrophorese in einer Kapillare. Ein 10 mW Argonlaser, dessen Hauptemission bei Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm liegt, regt die jeweiligen markierten Basen zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlung an.

Folgende Cycle Sequencing-Reaktionslösungen wurden hergestellt:

##### Reaktionslösung

BigDye Terminator Ready Reaction Mix	3 µl
Primer (5 pmol)	1µl
Template	x µl
HPLC-Wasser (Fa. J.T.Baker)	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

Das standardisierte Cycle Sequencing-Programm steuerte folgenden Ablauf:

Vorgang	Temperatur	Zeit	Sprung	Zyklen
1. Denaturierung	96°C	30 Sekunden		
2. Annealing	T <sub>m</sub> – 5°C	30 Sekunden		
3. Elongation	60°C	4 Minuten	1	24
4. Konservierung	4°C	Pause		

Die Aufarbeitung der Sequenzreaktionen fand durch ein Gelfiltrationssystem (Dye Ex 2.0 Spin Kit, Fa. Qiagen) nach Angaben des Hersteller statt. Das resultierende Eluat wurde in gerätespezifische Gefäße überführt und mit einem entsprechenden Septum verschlossen (Genetic Analyzer Sample Tubes 0,5 ml und Septa, Fa. Applied Biosystems).

## 4.9 Arbeitsmethoden zur Charakterisierung von Proteinen

### 4.9.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen

Um vergleichbare Bedingungen für Proteinassays zu schaffen, wurden  $2 \times 10^5$  bzw.  $1,3 \times 10^5$  Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen mit 3 ml Medium ausgesät. Entsprechend der experimentellen Fragestellung schlossen sich unterschiedliche Behandlungsschritte an. Alle folgenden Schritte zur Ernte und Präparation von Gesamtzellextrakten fanden auf Eis bzw. gekühlt statt, um die Degradation der Proteine zu minimieren. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. In 200 µl NP-40-Puffer fand die Lyse der Zellen bei 4°C für 10 Minuten unter ständigem Schütteln statt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst und in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 4°C pelletiert wurde. Nach Überführung der Überstände in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße folgte die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford (siehe 4.9.3). Es schloss sich die Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE (siehe 4.9.4) an. Die Proteinlysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<b>NP-40-Puffer:</b> (add 0,5 Liter)	<u>Endkonzentration</u>
25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5	50 mM Tris-HCl
15 ml 5 M NaCl	150 mM NaCl
2,5 ml Nonidet P-40 (NP-40, Fa, Sigma)	0,5% (v/v) NP-40
1,05 g Natriumfluorid (Fa.Merck)	50 mM NaF

frisch zuzufügen (add 10 ml):

100 µl 100 mM Natriumvanadat	1 mM $\text{NaVO}_3$
10 µl 1 M DTT	1 mM DTT
100 µl 100 mM PMSF-Lösung	1 mM PMSF
1 Complete Mini Tablette (Protease-Inhibitor-Cocktail, Fa. Roche)	

**1 M DTT-Lösung:** 1,54 g DTT (Fa. Sigma) wurden in 10 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und in 1 ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

**100 mM PMSF-Lösung:** 174 mg PMSF (Fa. Sigma) wurden in 10 ml 100 %igem Isopropanol gelöst und in 1 ml-Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**100 mM Natriumvanadat-Lösung:** 122 mg  $\text{NaVO}_3$  (Fa. Merck) wurden in 10 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.9.2 Isolierung nukleärer Proteine aus Lebergewebe

Das Lebergewebe wurde in Homogenisierungspuffer (2,2 Succrose) mit einem Potter homogenisiert. Pro Gramm entnommener Leber wurden 7 ml 2,2 M Succrosepuffer eingesetzt. Das Homogenat wurde auf ein 2,0 M Succrosekissen (4,5 ml/g Leber) geschichtet und zur Sedimentation der Zellkerne in einem 28.1-Swinging-Bucket-Rotor (Fa. Beckman) bei 25000 rpm 1 Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in 3 ml Kernlysepuffer resuspendiert. Die Kerne wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit einem Potter (Pestle A, Fa. Braun) homogenisiert. Eine Probe der lysierten Zellkerne wurde mit einer 0,5 %igen SDS-Lösung 1:20 verdünnt und der DNA-Gehalt wurde bei einer OD von 260 nm im Spektralphotometer bestimmt. Die Kernsuspension wurde auf eine Konzentration von 0,5 mg DNA/ml verdünnt. Zur Präzipitation der DNA wurde 4 M Ammoniumsulfatlösung (pH 7,9) bis zu einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben und 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die DNA Fällung erfolgte durch 60-minütige Zentrifugation bei 35000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ . Zur Präzipitation der Proteine wurde der Überstand mit festem Ammoniumsulfat (0,3 g/ml Suspension) versetzt und 30 – 60 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Die Kernproteine wurden für 35 Minuten bei 35000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  in einem TI-70 Rotor (Fa. Beckman) pelletiert. Das Proteinpellet wurde in 300  $\mu\text{l}$  Dialysepuffer resuspendiert. Diese Proteinlösung wurde in Dialyseschläuche gefüllt und 2-mal für 2 Stunden gegen Dialysepuffer zur Reinigung von niedermolekularen Verunreinigungen dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach BRADFORD (siehe 4.9.3) bestimmt. Die Proteine wurden aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



<b>Church-Hybridisierungslösung:</b> (add 0,5 Liter)	Endkonzentration
250 ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 9,0	0,5 M Phosphatpuffer, pH7,2
60 ml 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 3,8	
1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	1mM EDTA
175 ml 20% SDS	7 %SDS
<b>Succrosepuffer:</b> (add 1000 ml)	Endkonzentration
684,5g (753g) Succrose	2,0 M (2,2 M)
10 ml 1M HEPES (pH 7,6)	10 mM
5 ml 3 M KCl	15 mM
1,5 ml 0,1 M Spermin	0,5 mM
0,5 ml 1 M Spermidin	0,5 mM
2 ml 0,5 M EDTA (pH 8)	1 mM
100 ml Glycerol	10 %
<b>Kernlysepuffer:</b> (add 20 ml)	Endkonzentration
200 µl 1 M HEPES (pH 7,6)	10 mM
666 µl 3 M KCl	100 mM
4 µl 0,5 M EDTA	0,1 mM
60 µl 1 M MgCl <sub>2</sub>	3 mM
2 ml Glycerol	10 %
<b>Dialysepuffer:</b> (add 1000 ml)	Endkonzentration
25 ml 1 M HEPES (pH 7,6)	25 mM
13,3 ml 3 M KCl	40 mM
200 µl 0,5 M EDTA	0,1 mM
1 ml 1 M DTT	1 mM
100 ml Glycerol	10 %

#### 4.9.3 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Der Proteinassay basiert auf der Veränderung der Farbabsorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, die nach Bindung an Proteine erfolgt (BRADFORD

et al, 1976). Die Proteinkonzentrationen der Extrakte aus Zellkultur wurden durch dieses Verfahren ermittelt. 3 µl der Extrakte wurden mit 797 µl H<sub>2</sub>O vermischt und mit 200 µl Biorad-Dye-Reagent-Concentrate (Fa. BIO-RAD) versetzt. Die Proben wurden mit dem Vortexer durchgemischt. Die Blaufärbung der Probe wurde bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen und die Proteinkonzentration über eine BSA-Eichreihe berechnet.

#### **4.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteine wurden in SDS-Probenpuffer denaturiert und Polyanionen überführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Elektrophorese in denaturierenden SDS-Gelen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte (LAEMMLI, 1970). Sie werden durch Coomassie Färbung oder Westen Blot als Proteinbanden dargestellt. Die Größe der Proteine wird im Vergleich mit einem definierten Molekulargewichtsstandard bestimmt. Die jeweilige Menge Proteinlösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt, mit 5 x Probenauftragspuffer versetzt und bei 95°C 10 Minuten aufgekocht. Die Ansätze sowie 10 µl eines Molekulargewichtsstandards (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range, Fa. BIO-RAD) wurden auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 30 mA und 160 V. folgende Verbindungen und Lösungen wurden benötigt:

**TEMED** (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), Fa. Sigma

**Rotiphorese Gel 30**, Fa. Roth: 30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid

**1,5 M Tris-HCl, pH 8,8:** 90,8 g Tris in 0,5 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und pH 8,8 mit 1 N HCl einstellen.

**0,5 M Tris-HCl, pH 6,8-Lösung:** 30,3 g Tris in 0,5 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und pH 6,8 mit 1 N HCl einstellen.

**10% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung:** 1 g Ammoniumpersulfat (APS, Fa. Merck) wurden in 9 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C gelagert.

<b>12, 5 %iges Trenngel:</b> (add 10 ml)	<b>3%iges Sammelgel:</b> (add 5 ml)
--	-------------------------------------

4,06 ml Rotiphorese Gel 30	0,5 ml Rotiphorese Gel 30
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
3,28 ml dest. H <sub>2</sub> O	3,1 ml dest. H <sub>2</sub> O
100 µl 10%ige SDS-Lösung	50 µl 10 %ige SDS-Lösung
50 µl 10 %ige APS-Lösung	25 µl 10 %ige APS-Lösung
7,5 µl TEMED	7,5 µl TEMED

<b>10 x SDS-Laufpuffer:</b> (add 1 Liter)	<b>Endkonzentration</b>
---	-------------------------

30 g Tris	250 mM Tris
144 g Glycine (Fa. AppliChem)	1,92 M Glycine
10 g SDS	1 % SDS

<b>5x Probenauftragspuffer:</b> (add 30 ml)	<b>Endkonzentration</b>
---	-------------------------

15 ml 100 % Glycerol	50 % Glycerol
3 g SDS	5 % SDS
7,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	125 mM Tris-HCl, pH 6,8
Spatelspitze Bromphenolblau	

Der Probenauftragspuffer wurde in 1 ml Portionen alipuottiert und bei –20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 50 µl β-Mercaptoethanol pro ml Probenauftragspuffer zugefügt.

#### 4.9.5 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Die im Polyacrylamidgel durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue dargestellt werden. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 0,1 – 0,2 µg pro Proteinbande. Das gefärbte Gel wurde fotografiert und die Menge der geladenen Proteine kann mittels entsprechender Software (PC-BAS) ermittelt werden so dass Coomassie-gefärbte Gele als Beladungskontrolle für nachfolgende spezifische Nachweisverfahren wie z. B. Western-Blot dienen. Es wurde eine kolloidale Coomassie Suspension der Fa. Roth gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet.

#### 4.9.6 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden nach Anlegen einer elektrischen Spannung im auf eine Membran transferiert. Dort werden diese mit Hilfe spezifischer primärer Antikörper markiert, die wiederum von sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpern erkannt werden. Mit Hilfe der gekoppelten Peroxidaseaktivität lässt sich das gesuchte Protein durch Belichtung eines Röntgenfilms detektieren. Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in einer Semidry-Blot-Apparatur auf eine Nylonmembran (Immobilon-P Transfer Membrane, Fa. Millipore) transferiert. Der Proteintransfer wurde mit Transferpuffer bei Raumtemperatur bei 30 Volt bzw. 300 mA in 20 – 25 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Membran durch eine 1-stündige Inkubation in 5 %iger Magermilchlösung (Fa. Merck) in TBS-Tween abgesättigt, um den Anteil an unspezifischer Proteinbindung zu verringern. Es folgte nach kurzem Waschen in TBS-Tween die einstündige Inkubation mit dem spezifischen Antikörper, der nach den Angaben der jeweiligen Hersteller in Waschpuffer verdünnt wurde. Nach drei Waschvorgängen in TBS-Tween-Lösung wurde die Membran über einen Zeitraum von einer Stunde mit einer 1:10000 Verdünnung des sekundären Antikörpers inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBS-Tween-Lösung wurde der Blot anschließend mit dem Substratansatz gemäß den Herstellerangaben (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Fa. Perkin Elmer) entwickelt. Die durch die Peroxidase-Reaktion emittierte Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm dargestellt.

<b><u>Transferpuffer, pH 8,3:</u></b> (add 5 Liter)	<b><u>Endkonzentration</u></b>
14,5 g Glycine	39 mM Glycine
1,85 g SDS	0,037 % SDS
29,0 g Tris	48 mM Tris
1 Liter Methanol (Fa. J. T. Baker)	20 % Methanol
Der pH 8,3 wurde mit HCl eingestellt.	

<b>Waschpuffer (TBS-Tween) pH 7,6:</b> (add 5 Liter)	Endkonzentration
12,1 g Tris	20 mM Tris-HCl
19 ml 1 N HCl	4 mM HCl
40,0 g NaCl	137 mM NaCl
5,0 ml Tween 20 (Fa. Sigma)	0,1 % Tween 20

#### **4.9.6.1 Verwendete Antikörper**

Anti-Hepatitis C Virus Core-Antikörper (Fa. Abcam)

Phospho-specific-STAT3-Antikörper (Fa. Biolabs)

#### **4.9.7 Gel-Retentionsanalyse**

Zur Darstellung der Interaktion von Proteinen mit DNA-Fragmenten kann die Gel-Retentionsanalyse eingesetzt werden. Ein für das zu analysierende Protein bindungsspezifisches, radioaktiv markiertes DNA-Oligonukleotid wird unter geeigneten Bedingungen mit dem Proteingemisch inkubiert. Es bilden sich spezifische Protein-DNA-Komplexe. Anschließend folgt eine elektrophoretische Auftrennung in einem nativen Acrylamidgel. DNA-Proteinkomplexe trennen sich aufgrund ihres veränderten Laufverhaltens von nicht gebundenen Oligonukleotiden. Im „Super-Shift-Assay“ wird das an der Komplexbildung beteiligte Protein durch Zugabe spezifischer Antikörper identifiziert. Der Antikörper bindet an den Komplex aus Protein und DNA und führt somit zu einer Veränderung des Laufverhaltens im Polyacrylamidgel.

##### **4.9.7.1 Herstellung eines doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids**

Gleiche Mengen komplementärer DNA-Einzelstränge werden mit 10 x Annealing-Puffer versetzt und mit Wasser auf eine 1 x Konzentration des Annealing Puffers verdünnt. Ein Erhitzen für fünf Minuten bei 95°C denaturiert die Oligonukleotide.

Während des langsamen Abkühlens auf Raumtemperatur hybridisieren die Oligonukleotide zu einem Doppelstrang. Eine Lagerung erfolgt bei – 20°C.

### **10 x Annealingpuffer:**

200 mM Tris-HCl, pH 7,6

100 mM MgCl<sub>2</sub>

500 mM NaCl

### **4.9.7.1.1 Oligonukleotide**

STAT-3 Konsensusoligo für Gel-Retentionsanalysen:

5'-GTG CAT TTC CCG TAA ATG TTG TCT ACA-3'

5'-CAC GTA AAG GGC ATT TAC AAC AGA TGT-3'

NF- $\kappa$ B Oligo für Gel-Retentionsanalysen:

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'

5'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-3'

### **4.9.7.1.2 Verwendete Antikörper:**

Anti-p50-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

Anti-p65-Antikörper (Fa. Santa Cruz)

### **4.9.7.2 Radioaktive Markierung des doppelsträngigen Oligonukleotids**

Durch die Polynukleotid-Kinase des Bakteriophagen T4 (Fa. Biolabs) wird das doppelsträngige DNA-Fragment an den endständigen 5'-Hydroxygruppen mit <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP (Fa. Amersham) markiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C, werden die Oligonukleotide über ein Nick-Spin-Column (Fa. Pharmacia) von nicht gebundener Radioaktivität getrennt. Die radioaktive Aktivität des markierten Oligonukleotids wird am  $\beta$ -Counter ermittelt.

**Reaktionsansatz:**

3,3 µl Oligonukleotid (125 ng)

2,0 µl 10 x T4-Kinase-Puffer

9,7 µl H<sub>2</sub>O

1,0 µl T4-Kinase

**4.9.7.3 Trennung der Protein-DNA-Komplexe im Acrylamid-Gel**

Im Reaktionsansatz werden Proteinlösung (1 – 5 µg), 4 µl 5 x Bindungspuffer, 2 µl 10 x Proteinase-Inhibitorcocktail, 1 µl Poly dl:dC (1 µg/µl), 1 µl BSA (10 µg/µl in H<sub>2</sub>O) und <sup>32</sup>P-markiertes Oligonukleotid (30000 cpm/Reaktionsansatz) gegeben und mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Als Kontrolle dient der gleiche Bindungsansatz ohne Proteinzugabe. Die Reaktionsansätze werden 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wird 2 µl Auftragspuffer (20 %ige Ficoll suspension) hinzugefügt. Die Proben werden auf ein nicht denaturierendes Acrylamidgel (5 %) aufgetragen. Über einen Zeitraum von ca. zwei Stunden wird eine Spannung von 300 Volt angelegt. Das Gel wird 15 Minuten in Fixierlösung inkubiert und im Anschluss daran für 1 h bei 70°C auf einem Vakuum Gelrockner dehydriert. Es folgt eine Exposition bei – 80°C.

„Super-Shift“ Experimente werden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Dabei erfolgt nach der Inkubation des Reaktionsansatzes die Zugabe des spezifischen Antikörpers (0,5 – 2 µg/Probe) und eine 45-minütige Inkubation auf Eis.

**5 %iges Polyacrylamidgel, ad 50 ml:**

2,5 ml 5 x TBE

8,3 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid

39,2 ml dH<sub>2</sub>O

350 µl 10 %ige APS-Lsg.

50 µl TEMED

**0,25 x Laufpuffer: ad 1500 ml:**

75 ml 5 x TBE

1425 ml dH<sub>2</sub>O

**10 x Proteinase-Inhibitorcocktail: ad 1 ml:**

20 µl 1 M DTT

20 µl 0,1 M Pefabloc

200 µl Aprotinin-Lsg.

760 µl dH<sub>2</sub>O

**5 x Bindungs-Puffer, ad 1 ml:**

125 µl 1 M HEPES, pH 7,6

50 µl 0,5 M MgCl<sub>2</sub>

170 µl 1 M KCl

655 µl dH<sub>2</sub>O

**5 x TBE:**

0,045 M Tris-Base

0,44 M Borsäure

1 mM EDTA, pH 8,0

**Gelfixierer:**

10 % Essigsäure

20 % Methanol



## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Erhöhung der Virusreplikation Lamivudin-resistenter Hepatitis B Virus Mutanten durch Basale Core Promoter- und Precore-Mutationen**

#### **5.1.1 Untersuchung der Beeinflussung der HBV Replikation durch Mutationen *in vitro***

Das virale Genom besteht aus vier überlappenden offenen Leserastern (*open reading frames*; ORF). Das S-ORF kodiert für das Oberflächengen, das X-Gen hat regulatorische Funktionen und das Polymerase-Gen wird von den P-ORF kodiert. Das C-ORF kodiert für das HBV Core-Gen, das in den Precore-Bereich (PC) und der Core-Region aufgeteilt ist. Dieser Bereich ist für die Transkription der prägenomischen RNA und für die Translation des Nukleokapsids oder der PC RNA verantwortlich. Die PC RNA wird in das HBV e Antigen (HBeAg) translatiert, das ins Blut sezerniert wird [8].

HBeAg dient einerseits als Puffer gegen eine anti-HBc Immunantwort. Andererseits resultiert die anti-HBe Immunantwort in einer effizienten Reduktion der viralen Last und übt einen starken Selektionsdruck aus, so dass Mutationen entstehen, die zu einer geringen beziehungsweise keiner HBeAg Sekretion führen. Die häufigsten Varianten, die die HBeAg Expression beeinflussen sind PC Mutanten und die basalen Core Promoter (BCP) Mutationen [23, 28].

Bei der PC Mutation kommt es zu einem Austausch der Basen Guanin zu Adenin an der Nukleotidposition 1896 (G1896), wodurch ein TAG Stopcodon generiert wird und die HBeAg Translation unterdrückt wird. Diese Mutation tritt oft mit einem Nukleotidaustausch an Position 1858 auf. Hier kommt natürlicherweise ein Thymin in den HBV Genotypen B, D, E und G vor bzw. ein Cytosin beim Genotyp A. Letzterer wurde in dieser Arbeit verwendet.

Die am häufigsten vorkommenden BCP Mutationen sind die Nukleotidwechsel A1762T und G1764A, die zu einer Verminderung der HBeAg Expression von bis zu 70 % führen, die Replikation aber erhöhen. Die Reduktion der HBeAg Expression

wird offenbar durch eine reduzierte PC RNA Transkription vermittelt, während eine erhöhte Replikation durch eine verstärkte Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promoter und Mutationen im überlappenden HBx-Protein hervorgerufen wird [30].

Eine Therapie erfolgt mit Alpha Interferon und Nukleosidanaloga wie Lamivudin (LMV) oder Adefovir (ADV). Besonders bei Patienten mit PC Mutation ist der Erfolg der Interferon Behandlung oft sehr gering. Als zuverlässig gelten LMV und ADV, deren Behandlungsperiode allerdings mehrere Jahre beträgt [33].

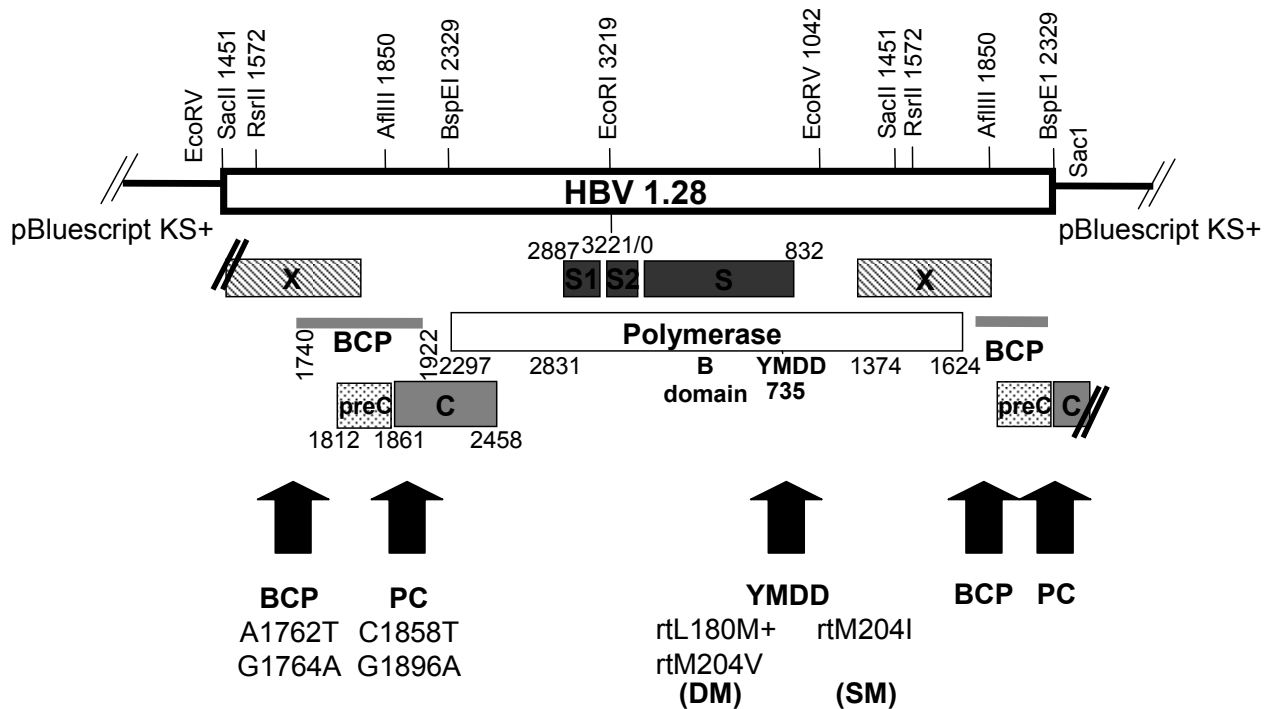
Ein Risiko ist die Selektion von Lamivudin-resistenten Mutanten. Dieses kommt in 66% der behandelten Patienten innerhalb von drei Jahren vor und zwar gleichermaßen bei HBeAg-positiven und –negativen Patienten. Es kommt zu einem Fortschreiten der Krankheit. Die häufigste Mutation beeinflusst das YMDD (Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat) Motiv, das sich im Polymerase Protein befindet. Das Methionin (M) der Aminosäure 204 ist dabei ersetzt durch Isoleucin (rtM204I) oder Valin (rtM204V). Die rtM204V Mutation wird begleitet von einem Leucin (L) zu Methionin (M) Austausch der Aminosäure 180 (rtL180M).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Kombination aus HBeAg-Minus-Mutationen und LMV-Resistenz Virusreplikation und Medikamentenresistenz beeinflusst.

### **5.1.1.1 Analyse der HBsAg und HBeAg Sekretion der HBV Wildtyp- und Mutationsplasmide**

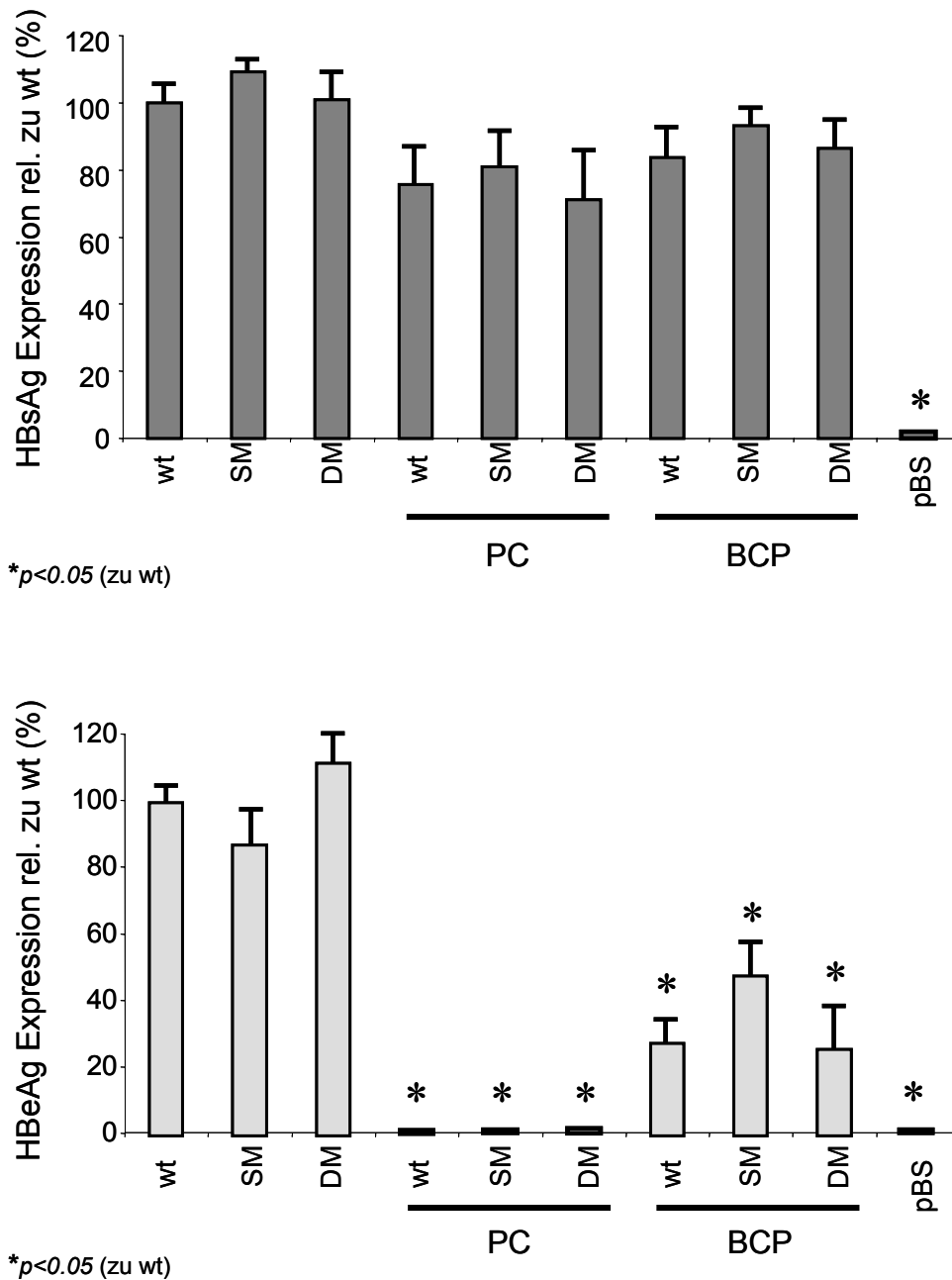
Um den Effekt der selektiven Precore-Mutationen und der Mutationen im basalen Core-Promoter auf die HBV Replikation und die Medikamentenresistenz zu untersuchen, wurden Mutationskonstrukte kloniert, die freundlicherweise von Dr. Frank Tacke und Dr. Thomas Bock für die Versuche zur Verfügung gestellt wurden. Diese Konstrukte beinhalten Punktmutationen C1858T/G1896A im Precore-Bereich (PC) sowie die A1762T/G1764A, die zu Mutationen im basalen Core Promoter (BCP) führen. Diese Mutationen wurden in Kombination mit der Wildtyp-Polymerase-Sequenz (BCP wt bzw. PC wt) oder mit Lamivudin-resistenten Mutanten mit Einzelmutation (single mutation; SM) rtM204I bzw. doppelter Mutation (double mutation; DM) rtL180M/rt204V in ein HBV Plasmid integriert. Damit dieses HBV-Plasmid Replikationskompetenz aufweist, muss es größer sein, als das einfache

Genom des Hepatitis B Virus. Daher sind ein Teil des X-Gens und ein Bereich des PreC/C-Gens, inklusive des Transkriptionsstartpunktes und des Polyadenylierungssignals, doppelt im 1.28 fachen HBV-Plasmid enthalten. Das HBV-Plasmid entspricht dem Genotyp A und Subtyp adw2 des Hepatitis B Virus.



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung des replikationskompetenten 1.28fachen HBV Vektor mit den wichtigsten Restriktionsenzymen.** In dem Polymerase-Gen sind sowohl Wildtyp wie auch Lamivudin-resistente Mutationen dargestellt (rtM204I oder rtL180M + rtM204V). Des Weiteren sind die BCP und PC Regionen mit Wildtyp-Sequenz und Mutationen A1762T und G1764A oder C1858T und G1896A abgebildet.

Für die Untersuchung der HBsAg und HBeAg Sekretion des HBV-Wildtyps und der unterschiedlichen Mutationen wurden humane Hepatomzellen (HuH-7) transient transfiziert. Vier Tage nach Transfektion wurde die HBsAg und HBeAg Expression der unterschiedlichen HBV-Konstrukte gemessen.



**Abb. 5.2: HBsAg (A) und HBeAg (B) Expression der unterschiedlichen HBV-Mutationen im Mediumüberstand.** Die HBsAg und HBeAg Sekretion wurde vier Tage nach transients Transfektion mit HBV wt oder Mutationskonstrukten gemessen. Die Werte wurden mit dem HBsAg und HBeAg Level des HBV wt verglichen. \* :  $p < 0,05$ ; wt = HBV Wildtypplasmid; PC = PreC-Mutation; BCP = Mutation im basalen Core Promoter; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBlueskript Plasmid. Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

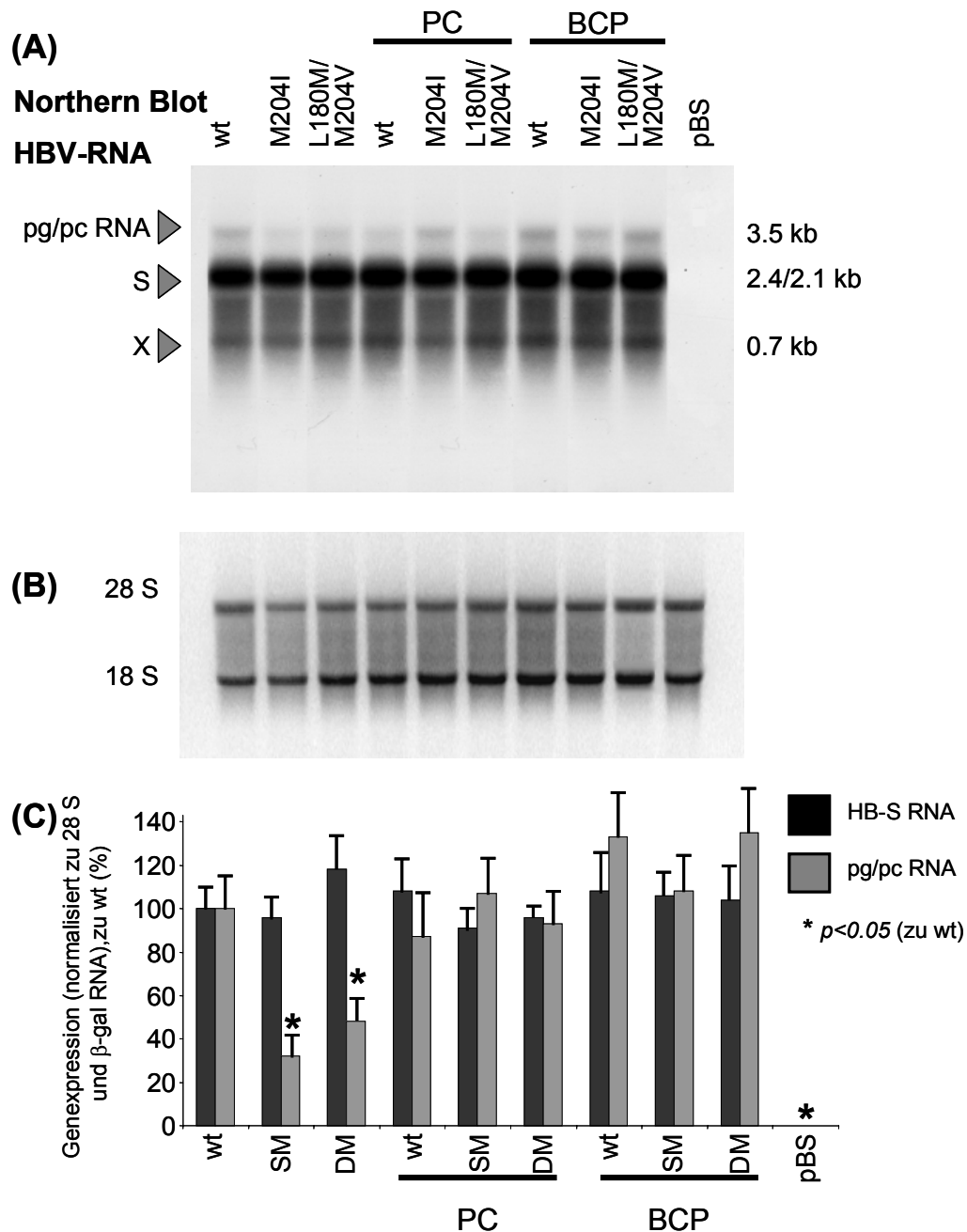
Die HBsAg Expression der verschiedenen transfizierten HBV-Mutanten unterschied sich nicht signifikant von dem HBV-Wildtyp Konstrukt (Abb. 5.2A). Im Gegensatz hierzu sekretierten die PC Mutationen C1858T/G1896A aufgrund des

Stop-Codons im Precore-Bereich kein HBeAg. Die HBeAg Expression war bei den BCP Mutationen um 50 bis 70 % im Vergleich zum Wildtyp vermindert (Abb.??).

### **5.1.1.2 Einfluss der HBV Mutationen auf die Effizienz der intrazellulären Replikation**

Die transkriptionelle Aktivität der unterschiedlichen HBV Mutanten wurde durch Analyse im Northern Blot untersucht. HuH-7 Zellen wurden mit dem HBV wt und den unterschiedlichen HBV Mutationen transient transfiziert. Die Gesamt-RNA wurde vier Tage nach Transfektion isoliert und im Northern Blot auf Expression HBV spezifischer Transkripte analysiert. Als Sonde wurde mit ein  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-radioaktiv markiertes Fragment eingesetzt, das aus einem Restriktionsverdau des 1.28 fachen Plasmides mit *EcoRV* und *RsrII* gewonnen wurde.

Die Signalstärke der HBV-S- und pregenomische-PC-RNA wurde durch Abgleich mit der  $\beta$ -Galactosidase Aktivität und der Intensität der 18S bzw. 28S Bande normalisiert (Abb. 5.3). Während die Expression der HBV-S mRNA keine signifikanten Unterschiede aufwies, war die pregenomische-PC mRNA der Lamivudin-resistenten Konstrukte rtM204I (SM) und rtL180M+rtM204V (DM) signifikant reduziert. Die Kombination dieser Mutationen mit den PC Mutationen führte zu einer Erhöhung der Expression der pregenomischen RNA auf Niveau des Wildtyp Konstruktes. Die Transfektion der BCP Mutationen unterstützte zusätzlich die Zunahme der pregenomischen RNA. Diese zusätzliche Erhöhung war aber im Vergleich zur Kombination mit den Precore Mutationen nicht signifikant.



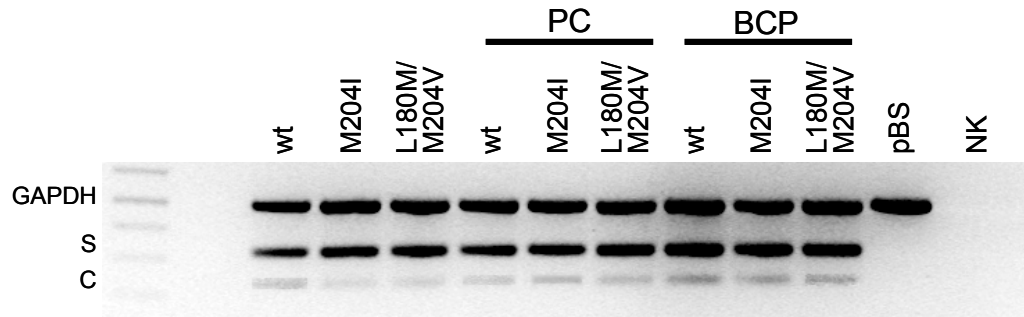
**Abb. 5.3: Northern Blot Analyse der HBV-spezifischen RNA vier Tage nach transients Transfektion von HuH-7 Zellen (A).** (B) 28 S und 18 S RNA. Die Quantifizierung der HBV-S RNA und der pregenomischen RNA wurde Verglichen mit der 28 S RNA gesetzt (C). Die Werte sind im Vergleich zum Wildtyp angegeben. \* :  $p < 0,05$ ; wt = HBV Wildtypplasmid; PC = PreC-Mutation; BCP = Mutation im basalen Core Promoter; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBlueskript Plasmid. Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

Zusätzlich wurde eine semiquantitative triplex RT-PCR durchgeführt. Hierbei wurden Primerpaare verwendet, die selektiv das HBV-S-Gen und das C-Gen des

Hepatitis B Virus detektieren. GAPDH wurde als zelluläres *housekeeping* Gen und interne Kontrolle ebenfalls durch entsprechende Primerpaare amplifiziert (Abb 5.4A).

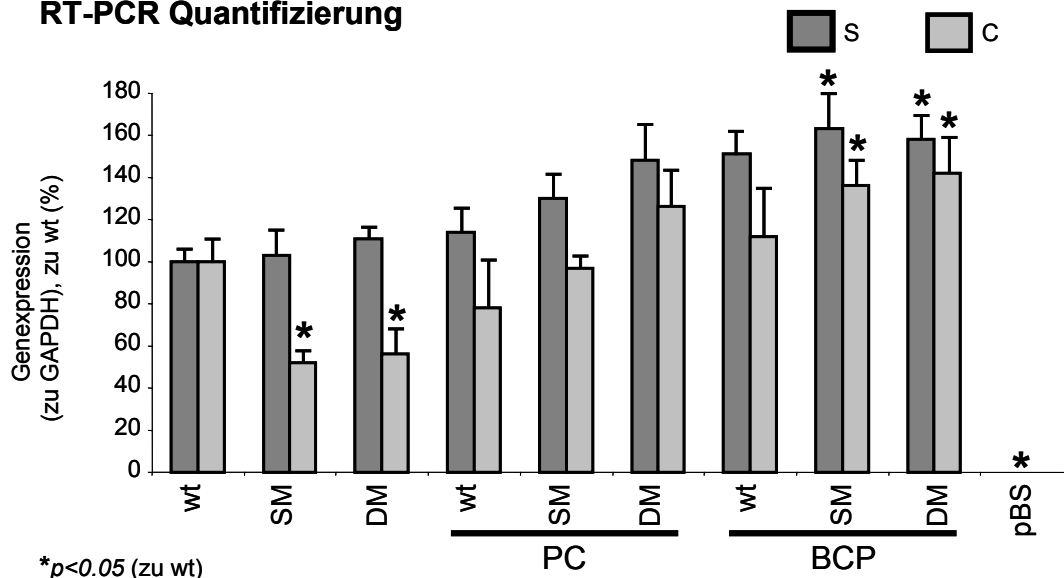
(A)

RT-PCR



(B)

RT-PCR Quantifizierung



**Abb. 5.4: Repräsentative semiquantitative triplex RT-PCR mit Primerpaaren, die das HBV-S Gen, die HBV-C Region (der pregenomischen RNA) und GAPDH (A).** Quantifikation wurde die S-mRNA und das C-Produkt relativ zur GAPDH Expression (B). Die Werte sind in Relation zur Expression des Wildtypes angegeben. \* :  $p < 0,05$ ; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBlueskript Plasmid; pg/pc RNA = pregenomische-PC RNA (3.5kb Bande). Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

LMV-resistenten Mutanten exprimieren signifikant weniger Core-mRNA als das Wildtypkonstrukt (Abb. 5.4). Die Kombination von BCP-Mutation mit der Einzel- bzw. Doppelmutante führte zu einem Anstieg der Expression der C-mRNA und der S-mRNA (Abb. 5.4B). Die Northern Blot Analysen belegten zudem, dass die Expression

der pregenomischer RNA nur bei den LMV-resistenten Mutanten reduziert war, während die Kombination mit den PC oder BCP Mutation zu einer Erhöhung der Transkription der pregenomischen RNA (3.5kb Bande) im Vergleich zum Wildtyp führte. Die Kombination mit der BCP Mutation bewirkte eine erhöhte Transkription der pregenomischen RNA im Vergleich zum Wildtyp (Abb.5.3).

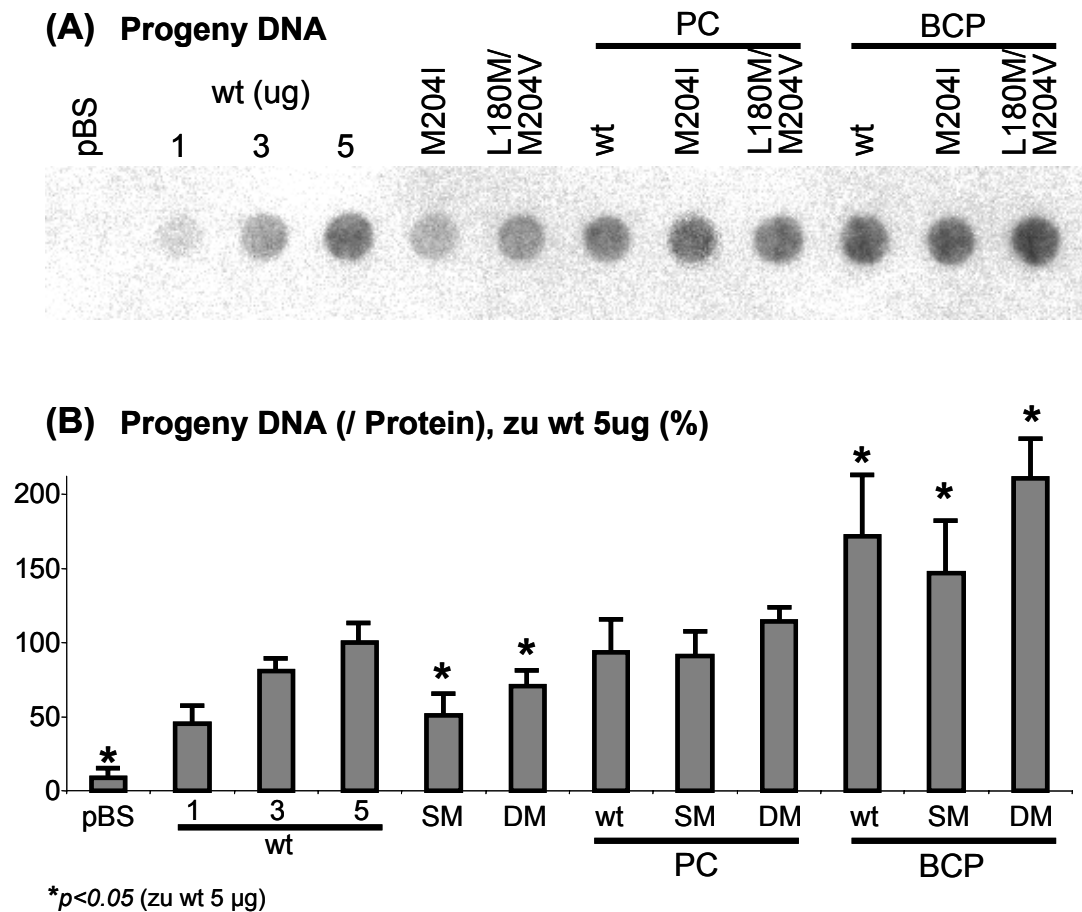
### **5.1.1.3 Analyse der Enkapsidierung der HBV Progeny DNA im Dot-Blot Assay**

Die Progeny DNA des Hepatitis B Virus wurde von den HuH-7 Zellen vier Tage nach transienter Transfektion mit den verschiedenen HBV Mutationsplasmiden isoliert. Die enkapsidierte HBV DNA wurde durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten HBV DNA Sonde im Dot-Blot detektiert (Abb. 5.5A). Die Intensität der Progeny DNA wurde mit dem Gesamtproteingehalt der gewonnen Zelllysate abgeglichen und quantifiziert (Abb. 5.5C). Eine Erhöhung der Menge transfiziertem pHBV1.28 wt Plasmids resultierte in einer linearen Erhöhung der detektierbaren enkapsidierten HBV Progeny DNA (Abb. 4.5A) und belegte die Quantifizierbarkeit der Methode (Abb. 5.5).

Transfektion von 5 µg der Einzel- bzw. Doppelmутanten führten zu einer signifikanten Reduktion der detektierbaren Progeny DNA (Abb. 5.5).

Kotransfektion von PC Konstrukt zusammen mit dem HBV wt Konstrukt hatte keinen Effekt auf die enkapsidierte DNA. Die Kombination von der PC Mutation mit der LMV-resistenten Mutation führte zu einer mit der Wildtyp Situation vergleichbaren Expression von Progeny DNA. Das BCP Konstrukt erhöhte die Menge der enkapsidierten DNA sowohl in Kombination mit Wildtyp HBV-DNA als auch mit den YMDD-Mutanten signifikant.





**Abb. 5.5: Detektion der Progeny DNA durch Analyse im Dot-Blot nach Immunpräzipitation der intrazellulären HBV Kapside vier Tage nach transienter Transfektion mit HBV wt und Mutationskonstrukten (A).** Die HBV wt DNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen transfiziert (1,3 und 5  $\mu$ g). Für die Transfektion der übrigen Konstrukte wurde 5  $\mu$ g DNA verwendet. \* :  $p < 0,05$ ; wt = HBV Wildtypplasmid; PC = PreC-Mutation; BCP = Mutation im basalen Core Promoter; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBlueskript Plasmid. Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

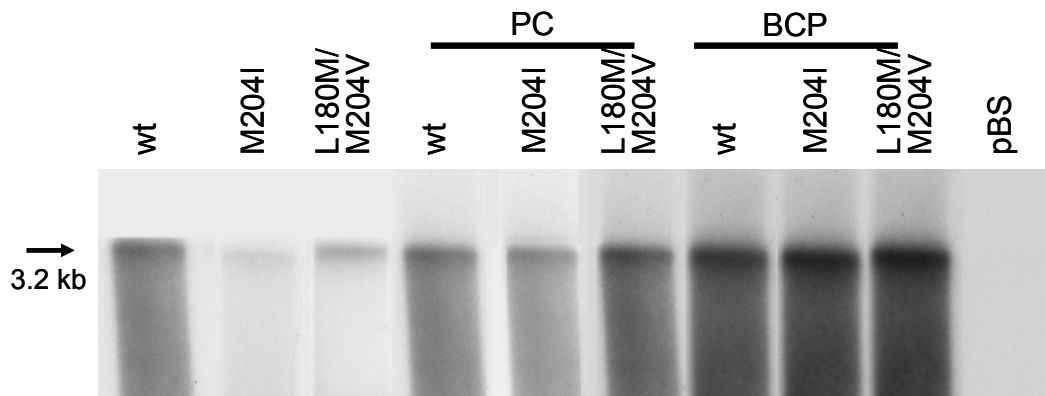
#### 5.1.1.4 Vergleich der Polymerase Aktivität der HBV Wildtyp- und Mutationskonstrukte

Die intrazelluläre HBV DNA Polymeraseaktivität wurde durch einen endogenen Polymeraseassay bestimmt, wobei die 3.2kb HBV DNA und kleinere Fragmente neu synthetisierter DNA detektiert werden. Dieser Versuch wurde von Dr. Frank Tacke durchgeführt.

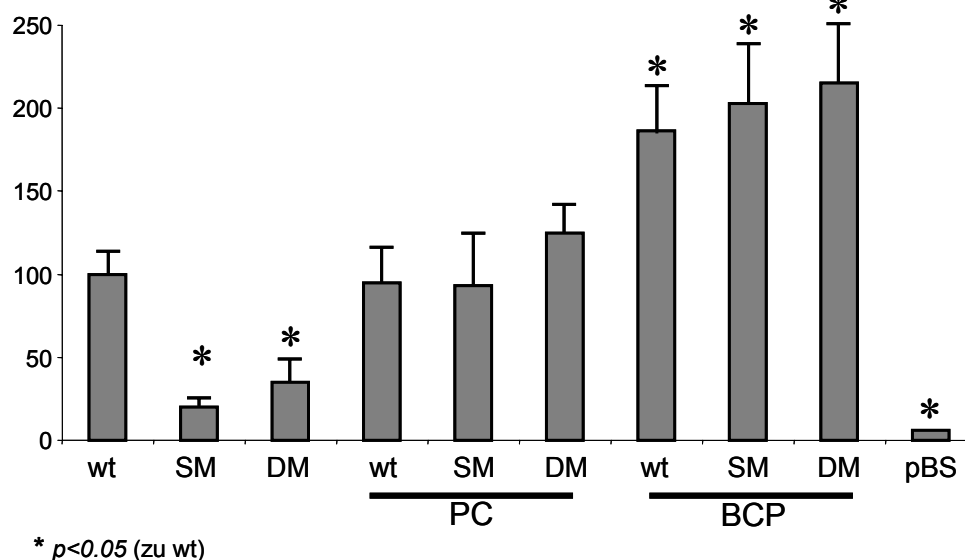
Die 3.2kb Bande der Einzel- bzw. Doppelmutationen in Abbildung 5.6B demonstrierte die signifikante Reduktion im Vergleich zum HBV Wildtyp. Die PC Mutationen allein und in Kombination mit den LMV-resistenten Mutationen führten zu

einer Polymeraseaktivität ähnlich der des Wildtyps, während die BCP Mutanten die Aktivität signifikant erhöhte.

### (A) Polymerase Assay



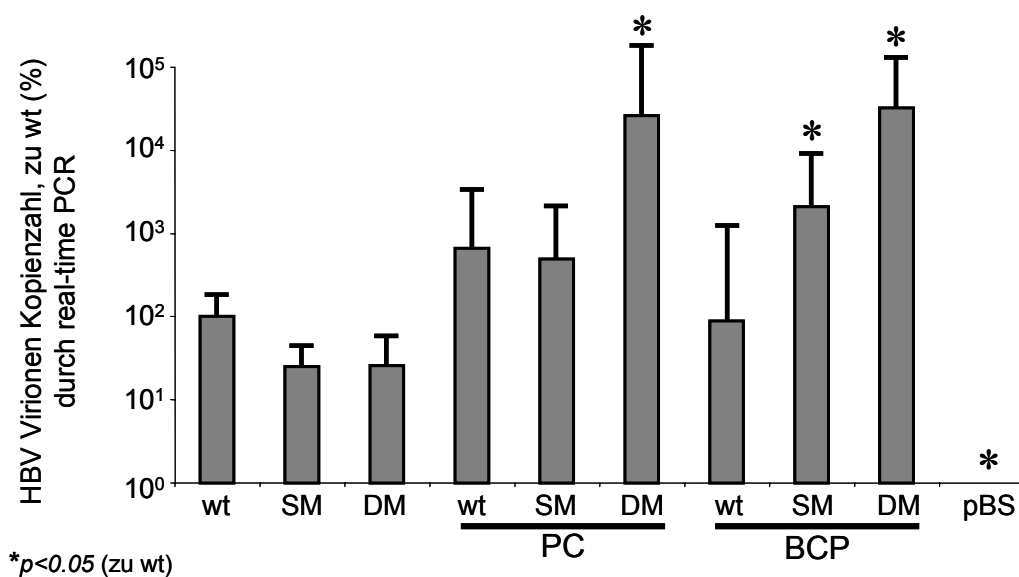
### (B) Quantifizierung des Polymerase Assays, zu wt (%)



**Abb. 5.6: Der Polymerase Assay zeigt die Aktivität der encapsidierten HBV DNA Polymerase (A).** Die Zellen wurden vier Tage nach Transfektion von jeweils 5 µg DNA des HBV wt und der Mutationskonstrukte lysiert. Die HBV Polymeraseaktivität wurde quantifiziert (B) und die Werte relativ zum Wildtyp dargestellt. \* :  $p < 0,05$ ; wt = HBV Wildtypplasmid; PC = PreC-Mutation; BCP = Mutation im basalen Core Promoter; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBlueskript Plasmid. Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

### 5.1.1.5 Einfluss der HBV Mutationen auf die extrazelluläre Sekretion von HBV Virionen

Virale HBV Partikel wurden durch Polyethylen Glycol Fällung aus dem Zellkulturüberstand vier Tage nach Transfektion von jeweils 5 µg DNA präzipitiert. Mit der gewonnenen HBV DNA eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Ein 189 bp Fragment der X-Region des Hepatitis B Virus wurde mit dem LightCycler (Fa. Roche Diagnostics) amplifiziert. Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine Standardverdünnung des linearisierten HBV1.0 wt Plasmides verwendet.

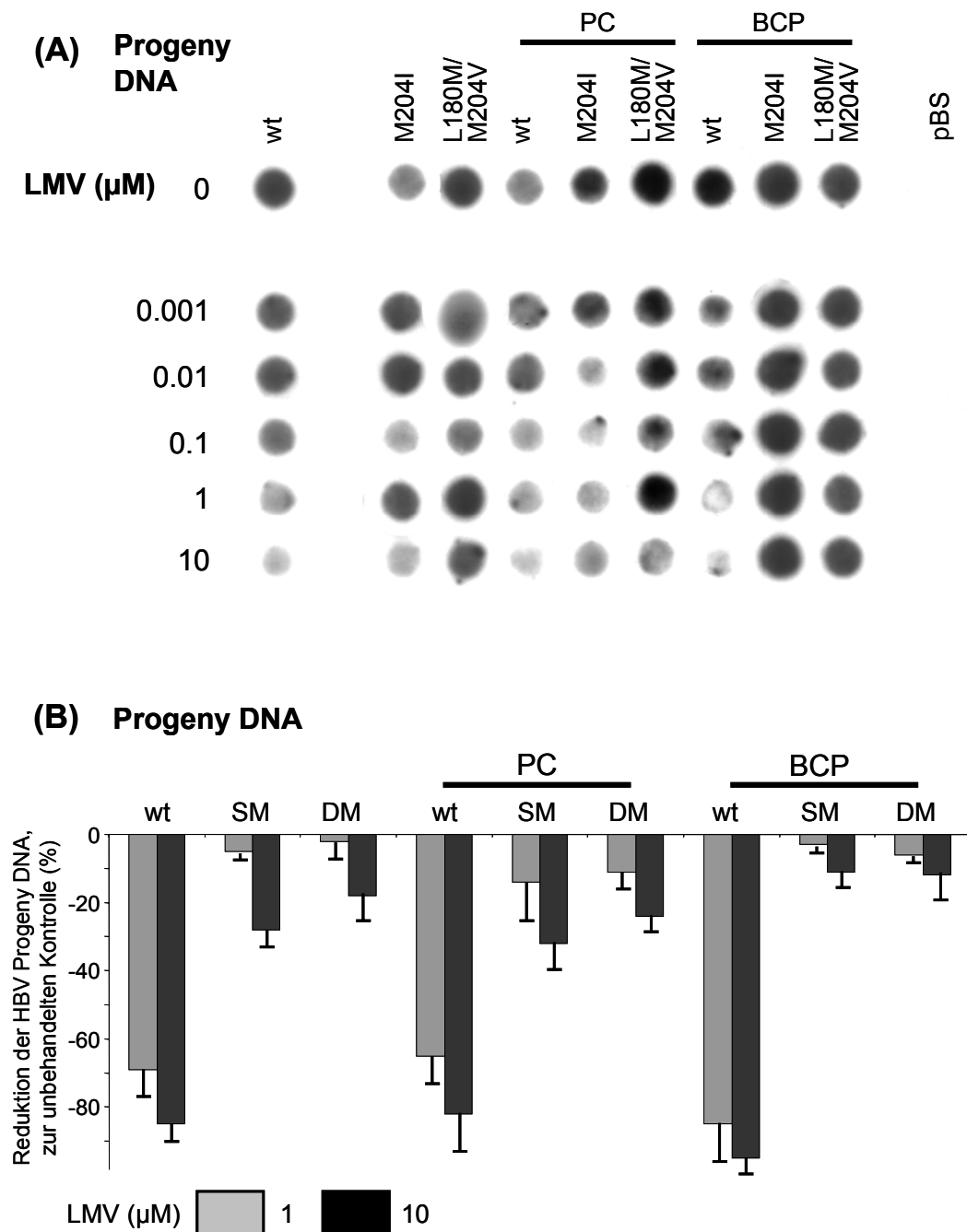


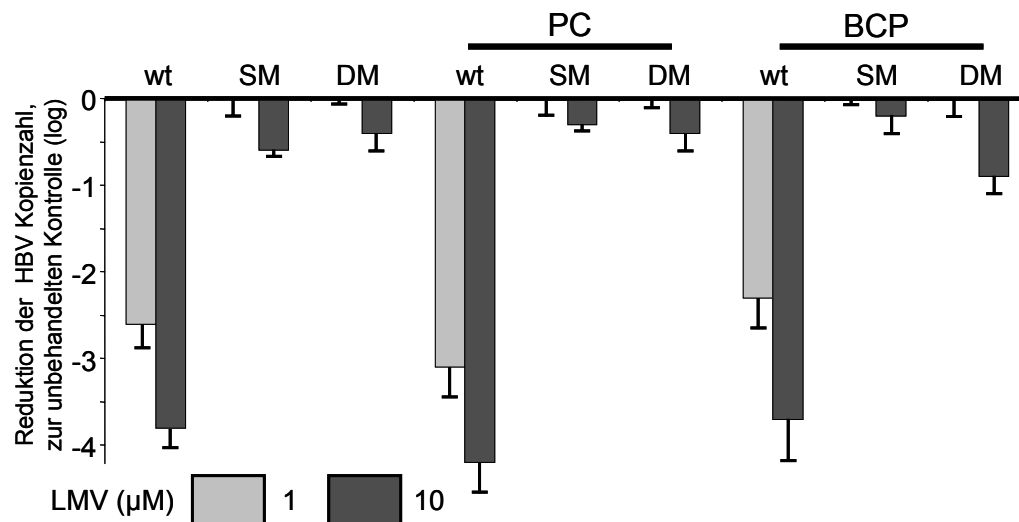
**Abb. 5.7: Quantifizierung der HBV Kopienzahl der aus dem Überstand gewonnenen viralen DNA durch real-time PCR.** Vier Tage nach transienter Transfektion der HBV wt DNA und der Mutationskonstrukte wurden die sekretierten Virionen durch PEG Präzipitation gewonnen. Die Werte sind mit der Kopienzahl des Wildtypkonstruktes abgeglichen. \* :  $p < 0,05$ ; wt = HBV Wildtypplasmid; PC = PreC-Mutation; BCP = Mutation im basalen Core Promoter; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBlueskript Plasmid. Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

Bei den LMV-resistenten Mutanten war, korrelierend zur Reduktion intrazellulärer Replikationsintermediate, auch die extrazelluläre Virion DNA reduziert. Die Kopienzahl der HBV Virionen nahm bei diesen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ab (Abb. 5.7). Durch die Kombination von PC-Mutation mit der YMDD-Mutationen rtL180M/rtM204V (DM) und BCP mit rtM204I (SM) bzw. BCP mit rtL180M/rtM204V (DM) war eine signifikant erhöhte Akkumulation der HBV Virionen im Mediumüberstand zu beobachten (Abb. 5.7).

### 5.1.1.6 Sensitivität von HBV Wildtyp und Mutationskonstrukten gegen Lamivudin und Adefovir

Um die Sensitivität der unterschiedlichen Hepatitis B Konstrukte gegenüber Nukleosidanaloga Lamivudin und Adefovir zu testen, wurden die Zellen mit jeweils 5 µg des HBV Wildtypkonstruktes und der Einzel- und Doppelmutante allein und in Kombination mit der PC bzw. BCP Mutante transfiziert. Dem Medium wurden einen Tag nach der Transfektion unterschiedliche hohe Konzentrationen der Medikamente zugegeben (LMV = 0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 µM).



**(C) Virionen (Mediumüberstand)**

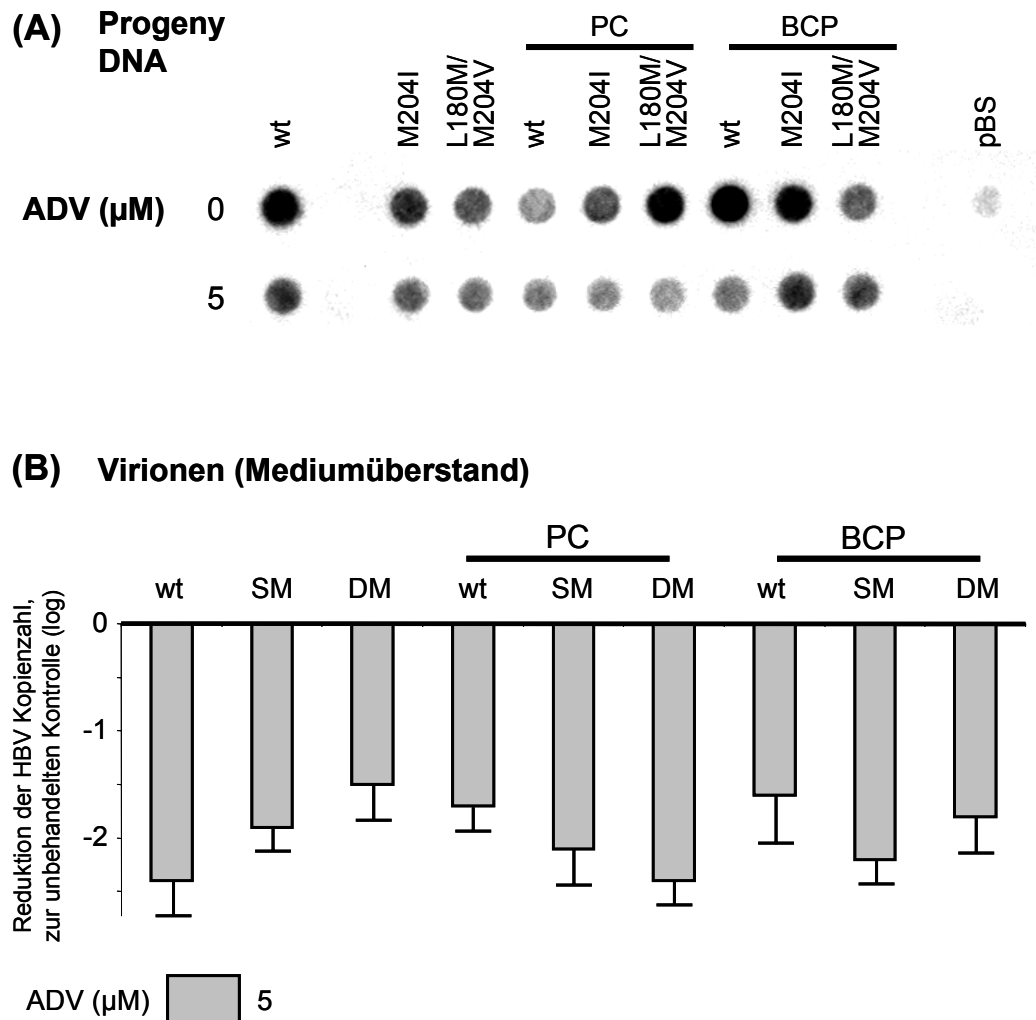
**Abb. 5.8: Sensitivität der Mutationen gegenüber LMV.** Die Progeny DNA der einzelnen Konstrukte wurde in einem Dot-Blot Assay nach Immunopräzipitation der intrazellulären HBV Kapside vier Tage nach transients Transfektion mit HBV wt oder Mutationskonstrukt detektiert (A). Das Medium enthielt 0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 µM LMV. Die Reduktion der HBV Progeny DNA bei Behandlung mit 1 und 10 µM LMV wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle quantifiziert (B). Zusätzlich wurden die HBV Virionen im Mediumüberstand durch real-time PCR quantifiziert (C). wt = HBV Wildtypplasmid; PC = PreC-Mutation; BCP = Mutation im basalen Core Promoter; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBlueskript Plasmid. Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

Vier Tage nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die enkapsidierte HBV DNA wurde im Dot Blot analysiert (Abb. 5.8A und B). Die sekretierten HBV Virionen wurden aus dem Überstand durch PEG Präzipitation gewonnen und durch real-time PCR quantifiziert um die extrazelluläre Ausschleusung der HBV Virionen zu detektieren (Abb. 5.8C).

Die enkapsidierte DNA der einzelnen Konstrukte wurden nach Applikation von 1 oder 10 µM LMV mit der enkapsidierten DNA ohne Lamivudinbehandlung verglichen. Die YMDD Mutanten (SM und DM) exprimieren dabei deutlich weniger Progeny DNA als die HBV Wildtypvariante. Die Transfektion von PC und BCP Mutationen beeinflusste nicht die Bildung von enkapsidierter DNA und führte zu keiner Veränderung der Sensitivität gegenüber Lamivudin (Abb. 5.8C)..

Lamivudin reduzierte die Virionenzahl um bis zu 4 Log Stufen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Das zeigte die Quantifizierung der extrazellulären HBV Virionen durch real-time PCR (Abb. 5.8C).

Für die Auswirkungen einer Adefovirbehandlung wurden die Konstrukte wie oben beschrieben transfiziert und einen Tag nach transients Transfektion mit 5  $\mu$ M Adefovir bzw. ohne Medikament behandelt.



**Abb. 5.9: Sensitivität der Mutationen gegenüber ADV.** Die Progeny DNA der einzelnen Konstrukte wurde in einem Dot Blot Assay nach Immunopräzipitation der intrazellulären HBV Kapside vier Tage nach transients Transfektion mit HBV wt oder Mutationskonstrukt detektiert (A). Das Medium beinhaltet 0 oder 5  $\mu$ M ADV. Zusätzlich wurden die HBV Virionen im Mediumüberstand durch real-time PCR quantifiziert (B). Hierfür wurden die sekretierten Virionen vier Tage nach Transfektion präzipitiert. Die Log-fache Reduktion der HBV Virionen Kopienzahl nach Behandlung mit 5  $\mu$ M ADV wurde mit der Kopienzahl ohne Behandlung verglichen. wt = HBV Wildtypplasmid; PC = PreC-Mutation; BCP = Mutation im basalen Core Promoter; SM = single mutant (rtM204); DM = double mutant (rtL180M/rtM204V); pBS = pBluescript Plasmid. Der Versuch wurde dreifach wiederholt. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationen zwischen den Experimenten.

Vier Tage nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und der Einfluss des Medikaments mittels Quantifizierung der intrazellulären Progeny DNA im Dot Blot (Abb. 5.9A) und durch die Messung der extrazellulären HBV Virionen im

Mediumüberstand durch real-time PCR (Abb. 5.9B) bestimmt. Diese Experimente zeigen, dass alle Mutationen gegenüber Adefovir sensitiv sind. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzelmutationen bzw. Mutationskombinationen festgestellt werden.

Außerdem zeigen diese Daten, dass die durch die YMDD-Mutationen vermittelte Lamivudin-Resistenz nicht durch zusätzliche Mutationen in der PC oder BCP-Region des HBV Genoms aufgehoben oder komprimiert werden konnte und dass die YMDD, PC und BCP Mutationen zu keiner Verminderung der Adefovir-Sensitivität führten.

## **5.2           Suppression der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein**

### **5.2.1       Untersuchung der Beeinflussung der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein *in vitro***

Eine „occulte“ HBV Infektion in HBsAg-negativen Patienten ist häufig mit einer gleichzeitigen chronischen HCV Erkrankung assoziiert [54]. Die Koinfektion führt zu einer beschleunigten Entwicklung von chronischem Leberversagen und Leberzirrhose [55]. Zudem treten gehäuft fulminante bzw. subfulminante Hepatitiden auf. Neben diesen langfristigen Effekten beobachtet man kurzzeitige direkte Einflüsse vor allem in Bezug auf die molekularen Parameter der HBV Replikation. So supprimiert eine HCV Koinfektion die HBV Replikation und führt zu einer früheren *Seroclearance* des HBsAg [56].

*In vitro* Versuche mit humanen Hepatomzellen (HuH-7 Zellen) zeigten, dass insbesondere das Core-Protein des Hepatitis C Virus einen Einfluss auf die HBV Replikation hat. Die Expression der HBV-spezifischen HBsAg und HBeAg wird durch das HCV Core-Protein exprimierende Plasmid um das zwei- bis vierfache reduziert. Die Sekretion viraler HBV Partikel, beispielsweise virale Nukleokapside und Virionen, ist 20-fach supprimiert [35].

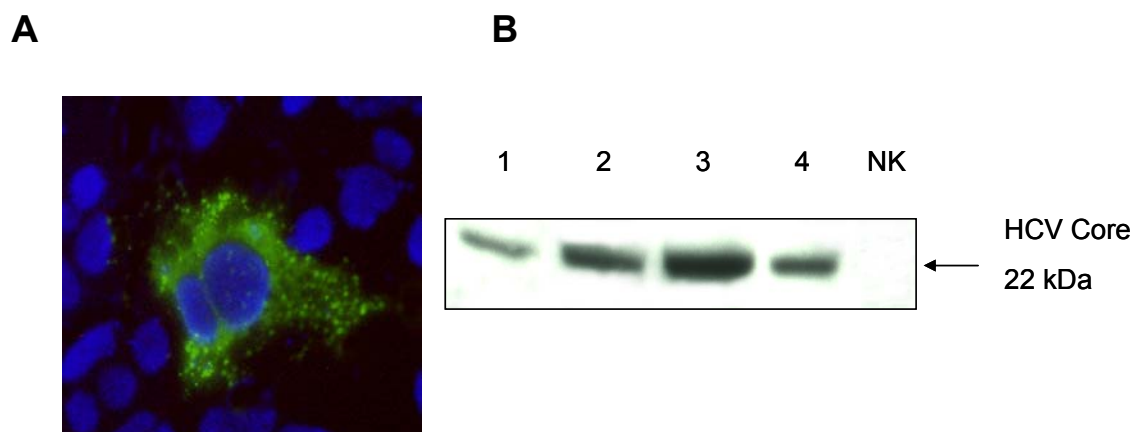
Es soll ein *in vitro* Zellkultursystem etabliert werden, dass die Suppression der HBV-Replikation durch das HCV Core-Protein bestätigt. Dieses *in vitro* System dient als Grundlage zur Entwicklung eines *in vivo* Maus-Modells, in dem die mit einer HBV bzw. HBV/HCV Infektion assoziierten immunmodulatorischen Vorgänge und die Aktivierung von Signaltransduktionswegen in den unterschiedlichen Zellpopulationen der Leber und des Immunsystems analysiert werden können.



### 5.2.1.1 Nachweis der Expression des HCV Core-Proteins im Cytoplasma und im Nukleus von HuH-7 Zellen

Humane Hepatomzellen (HuH-7 Zellen) wurden mit pHBV1.5 transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Kotransfektion mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-HCVcore durchgeführt, das das 572 bp umfassende Core-Gen des Genotyps 1a enthält.

Für die Transfektion wurden jeweils 1 µg DNA eingesetzt. Die Expression des HCV Core-Proteins konnte 24 Stunden nach der Transfektion durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Das Protein konnte ausschließlich im Cytoplasma der Zellen detektiert werden (Abb. 5.10A).



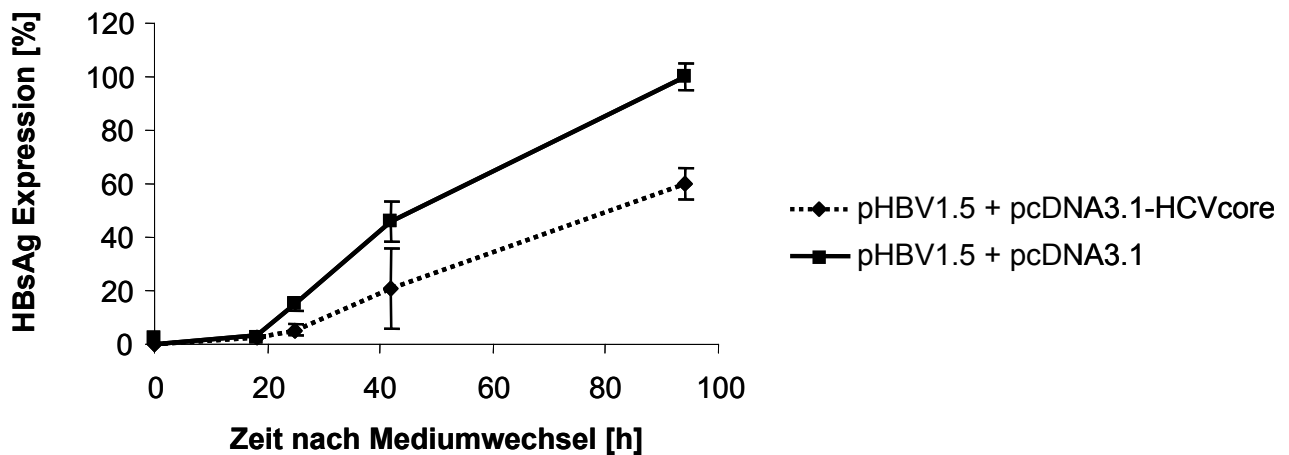
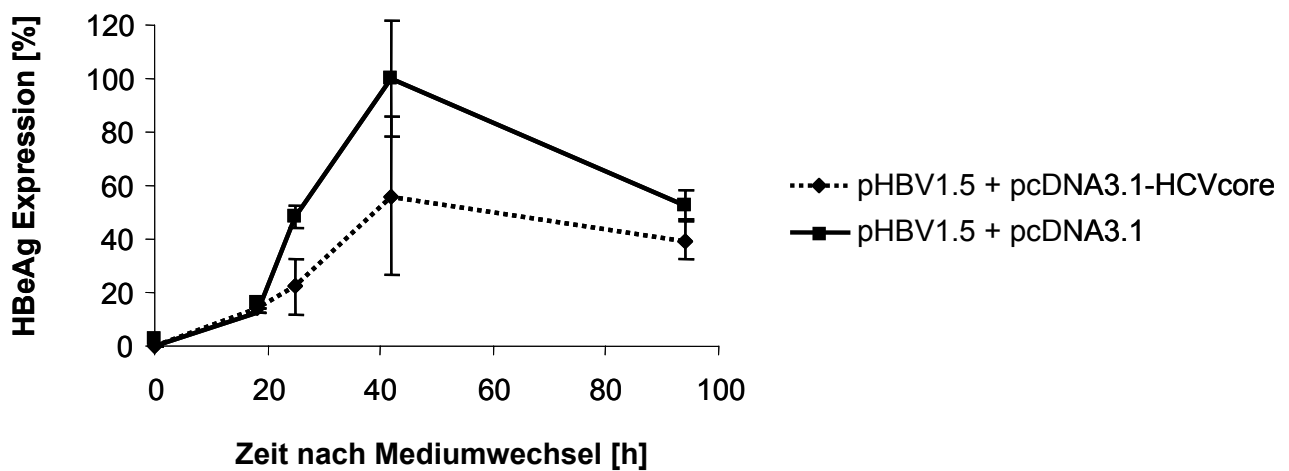
**Abb. 5.10: Analyse der Expression des HCV Core-Proteins in transient transfizierten HuH-7 Zellen.** **A** Detektion des HCV Core-Proteins im Cytoplasma durch Immunfluoreszenz. Grün angefärbt ist das HCV Core-Protein. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt **B** Western Blot-Nachweis: **1** Kernprotein 48 h nach Transfektion von HuH-7 Zellen **2** Kernprotein 72 h nach Transfektion von HuH-7 Zellen **3** Gesamtzellproteine 48 h nach Transfektion von HuH-7 Zellen **4** Gesamtzellproteine 72 h nach Transfektion von HuH-7 Zellen **NK** Gesamtzellprotein 48 h nach Transfektion von HuH-7 Zellen transfiziert mit pBS-HBV1.28wt und pcDNA3.1.

Zusätzlich wurden Western Blot Analysen zur Expression des HCV Core-Proteins 48 und 72 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Das HCV Core-Protein ist sowohl in Gesamtprotein- als auch in den Kernproteinextrakten nachweisbar. Die Ergebnisse zeigten, dass das HCV Core-Protein 24 Stunden nach transients Transfektion im Cytoplasma detektierbar ist.

#### **5.2.1.2 Reduktion der HBsAg und HBeAg Sekretion ins Medium durch transienter Kotransfektion**

Um zu überprüfen, ob das HCV Core-Protein die Expression von HBV Replikationsintermediaten beeinflusst, wurde nach Kotransfektion von pcDNA3.1-HCVcore und pHBV1.5 18 – 96 Stunden nach Transfektion der Hepatomzellen die HBsAg und die HBeAg Expression bestimmt. Die Detektion der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität diente dabei als Abgleich der Transfektionseffizienz.

Kotransfektion von pHBV1.5 und des HCV Core-Proteins führten 24 und 42 nach Transfektion beider Plasmide zu einer signifikanten Reduktion der HBsAg Expression. Durch die Kotransfektion von dem HCV Core Expressionsplasmid mit dem replikationskompetenten HBV wt Plasmides wurde die Expression sowohl von HBsAg und HBeAg um bis zu 40 % supprimiert (Abb. 5.11).

**A****B**

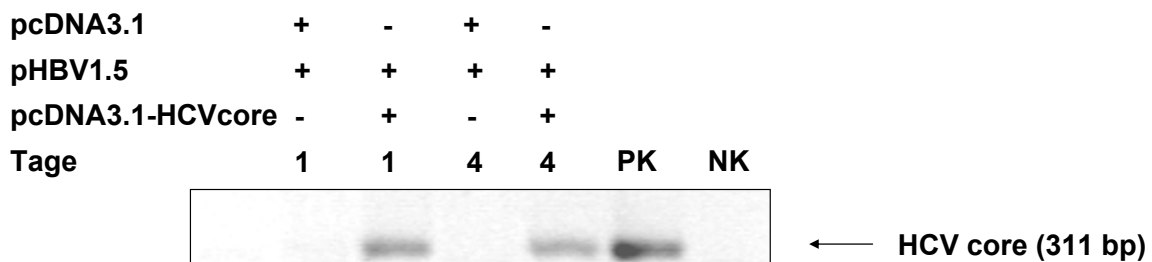
**Abb. 5.11:** Zeitlicher Verlauf der HBsAg und HBeAg Konzentration nach transienter Transfektion von Huh7-Zellen mit pHBV1.5 allein und zusammen mit pcDNA3.1-HCVcore. HBsAg **A** und HBeAg Konzentrationen **B** im Mediumüberstand wurden nach 18, 24, 42 und 96 Stunden nach Transfektion gemessen. Der Maximalwert wurde als 100% gesetzt und alle anderen Werte wurden ausgehend davon in % berechnet.

## 5.2.2 Analyse der Suppression der HBV Replikation durch HCV Core-Protein *in vivo*

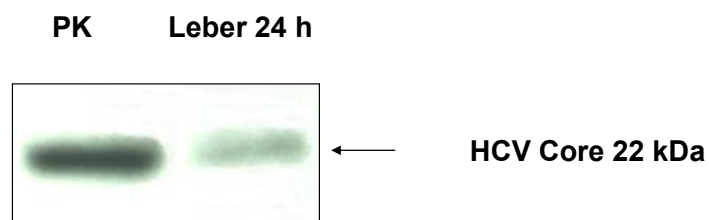
Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es das *in vitro* Modell der HBV-HCV Core-Protein Interaktion in ein *in vivo* System zu übertragen in dem das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen und der intrazellulären Signalwege in diesen Zellen

untersucht werden kann. Die Intravenöse Injektion von linearisiertem Expressionsplasmid in hohem Flüssigkeitsvolumen in die Schwanzvene von Mäusen (*hydrodynamische in vivo Transfektion*) resultiert insbesondere in Hepatozyten in einer effizienten Expression exogener Gene [50]. Durch dieses Verfahren kann in der Leber der Tiere die Expression HBV spezifischer Transkripte und Proteine induziert werden [53]. Dieses System wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Untersuchung der Interaktion von HCV Core-Protein auf die HBV Replikation und Antigenexpression verwendet. Hierzu wurden Mäuse aus dem Inzuchtstamm FVB/N durch hydrodynamische Transfektion der Schwanzvene injiziert. Die Tiere hatten ein Alter von 7 – 9 Wochen alt und wogen im Mittel 24 Gramm. Die Versuche wurden ausschließlich mit Männchen durchgeführt. Für die Injektion wurden 1,8 ml 0,9 % NaCl und 1 µg eines replikationskompetenten HBV Plasmides (pHBV1.5) innerhalb von 5 – 6 Sekunden transfiziert. Die Plasmide pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore wurden linearisiert da dadurch die Transfektionseffizienz optimiert werden kann (Christian Klein, persönliche Mitteilung).

## A



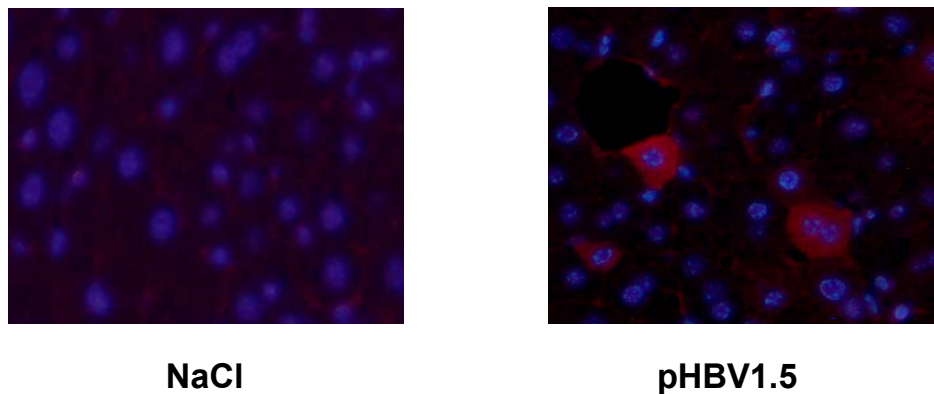
## B



**Abb. 5.12: Nachweis der Expression des HCV Core-Proteins in der Leber von transfizierten FVB/N Mäusen.** **A** FVB/N Mäuse wurden mit pHBV1.5 (1 µg/Tier) und pcDNA3.1-HCVcore (20 µg/Tier) durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion transfiziert. Die Leber wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entfernt und Gesamt-RNA wurde isoliert. Die hydrodynamische Transfektion von pcDNA3.1-HCVcore führt zur Expression der HCV Core-mRNA in der Leber injizierter FVB/N Mäuse. **B** Western Blot-Nachweis: Positivkontrolle und Gesamtzellproteine aus Leber behandelter FVB/N Mäuse 24 h nach Injektion mit HCVcore.

Aus den Lebern der Mäuse wurde die Gesamt-RNA einen Tag und vier Tage nach hydrodynamischer Transfektion extrahiert. Mittels RT-PCR (Abb. 5.12A) wurde ein 311 bp Fragment aus dem Bereich des Core-Proteins amplifiziert um die Expression von HCV Core-Transkripten in der Leber nachzuweisen.

Analog wurde aus der Leber der injizierten Tiere Gesamtprotein 24 Stunden nach Injektion extrahiert. Durch Analyse im Western Blot mit einem Anti-HCV-Core-Antikörper, konnte die Expression des 22 kDa großen HCV Core-Proteins nachgewiesen werden (Abb 5.12B). Bei den mit pHBV1.5 injizierten Mäusen konnte 4 Tage nach hydrodynamischer Transfektion das Core-Protein des HBV in Hepatozyten durch Immunfluoreszenz mit einem HBV Core spezifischen Antikörper detektiert werden (Abb 5.13)



**Abb. 5.13: Detektion des HBV Core-Protein in Hepatozyten von hydrodynamisch transfizierten FVB/N Mäusen durch Immunfluoreszenz.** Das HBV Core-Protein wurde vier Tage nach Injektion von FVB/N Mäusen mit pHBV1.5 auf Kryoschnitten detektiert. Blau angefärbt sind die Zellkerne (DAPI-Färbung) und rot gefärbt sind die Hepatozyten, die HBV Core-Protein exprimieren.

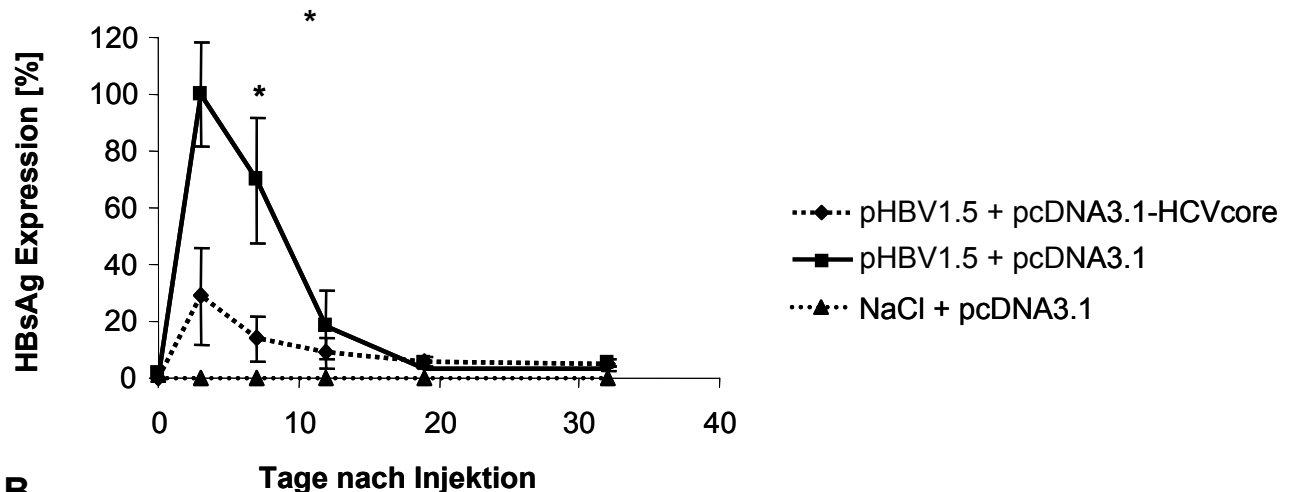
### **5.2.2.1 Suppression der HBsAg und HBeAg Expression im Serum kotransfizierter FVB/N Mäuse**

Für die Untersuchung der Expression HBV spezifischer Antigene wurde die HBsAg und HBeAg Sekretion im Serum gemessen. Eine Gruppe wurde mit replikationskompetentem pHBV1.5 Plasmid intravenös injiziert, die zweite Gruppe erhielt gleichzeitig pcDNA3.1-HCVcore Plasmid. Zusätzlich wurde einer Kontrollgruppe eine äquivalente Menge NaCl-Lösung bzw. pcDNA3.1-Plasmid injiziert um potentielle Einflüsse der Injektion bzw. des Vektors zu analysieren. Jede

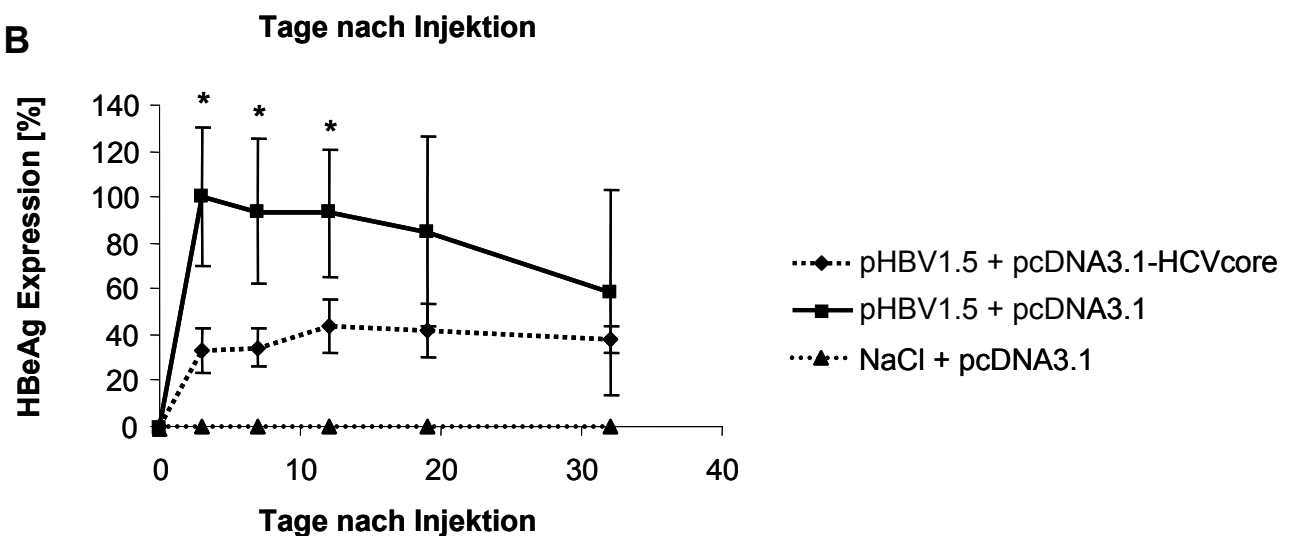
Gruppe bestand aus 3 – 7 Tieren. Das Serum wurde nach 4, 7, 12, 19 und 32 Tagen nach retroorbitaler Blutentnahme gewonnen.

Die höchste HBsAg Expression war 4 Tage nach Injektion der Tiere mit pHBV1.5 im Serum nachweisbar (Abb. 5.14). HCV Core-Protein Koinjektion resultierte in einer signifikanten Suppression des HBsAg und HBeAg Titers zwischen Tag 4 und 19 nach Injektion.

**A**



**B**

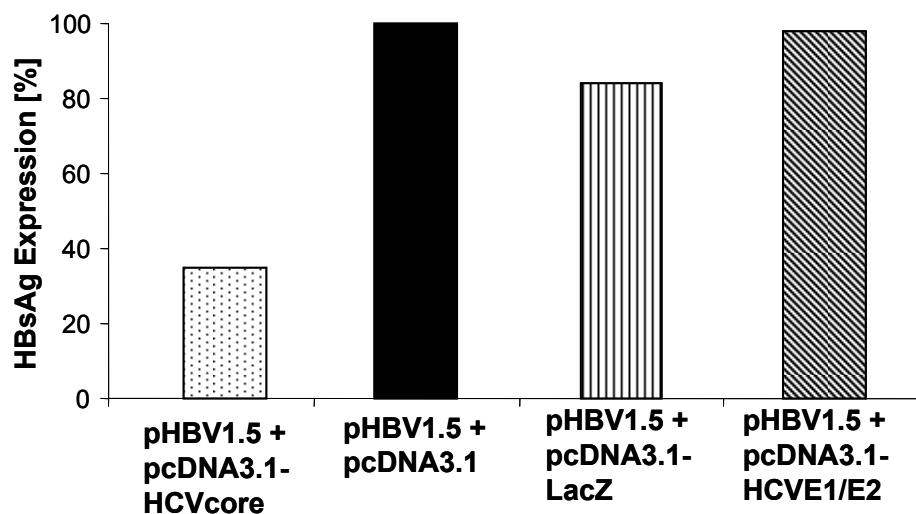


**Abb. 5.14: Zeitlicher Verlauf der HBsAg und HBeAg Konzentration im Serum von FVB/N Mäusen.** Die HBsAg Expression wurde durch hydrodynamische Transfektion von FVB/N Mäusen mit einem HBV replikationskompetenten Plasmid (pHBV1.5: 1 µg/Tier) induziert. Gleichzeitige Transfektion eines HCV core kodierenden Plasmides (pcDNA3.1-HCVcore: 20 µg/Tier) reduziert die Expression von HBsAg **A** und HBeAg **B** im Serum der Tiere. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus Serum von 3 – 7 Tieren die HBsAg und HBeAg Konzentration durch einen kommerziellen Assay (Fa. Abbott Laboratories, Chicago, Ill) gemessen. \*:p < 0,01. Der Maximalwert wurde als 100% gesetzt und alle andweren Werte wurden ausgehend davon in % berechnet.

In FVB/N Mäusen, die mit dem replikationskompetenten HBV Plasmid und pcDNA3.1-HCVcore hydrodynamisch kotransfiziert wurden, war die HBsAg Expression deutlich geringer. Wie bei der Injektion mit pHBV1.5 war auch bei der Koinjektion die höchste Expression des HBs Antigens 4 Tage nach Transfektion messbar, wobei der Titer um ca. 70 % supprimiert war (Abb. 5.14a).

Die Expression des HBe Antigens (Abb. 5.14B) wurde ebenfalls zu den oben genannten Zeitpunkten im Serum nachgewiesen und verglichen. FVB/N Mäuse wiesen hohe HBeAg Titer auf, die innerhalb der beobachteten 32 Tage nur langsam abnahmen (von 100 % auf 58 %). Gleichzeitige Transfektion des HCV Core-Protein exprimierenden Plasmides reduzierte die Expression von HBeAg im Serum der Tiere um das 3 – 4 fache. Zwischen 3 und 7 Tagen nach Transfektion war die HBeAg Expression der kotransfizierten Mäuse signifikant supprimiert (Abb. 5.14b).

Um die Spezifität dieses Effektes zu untersuchen, wurde das Plasmid pHBV1.5 zusätzlich mit den Expressionsplasmiden pcDNA3.1-HCVE1/E2 und pcDNA3.1-LacZ kotransfiziert.



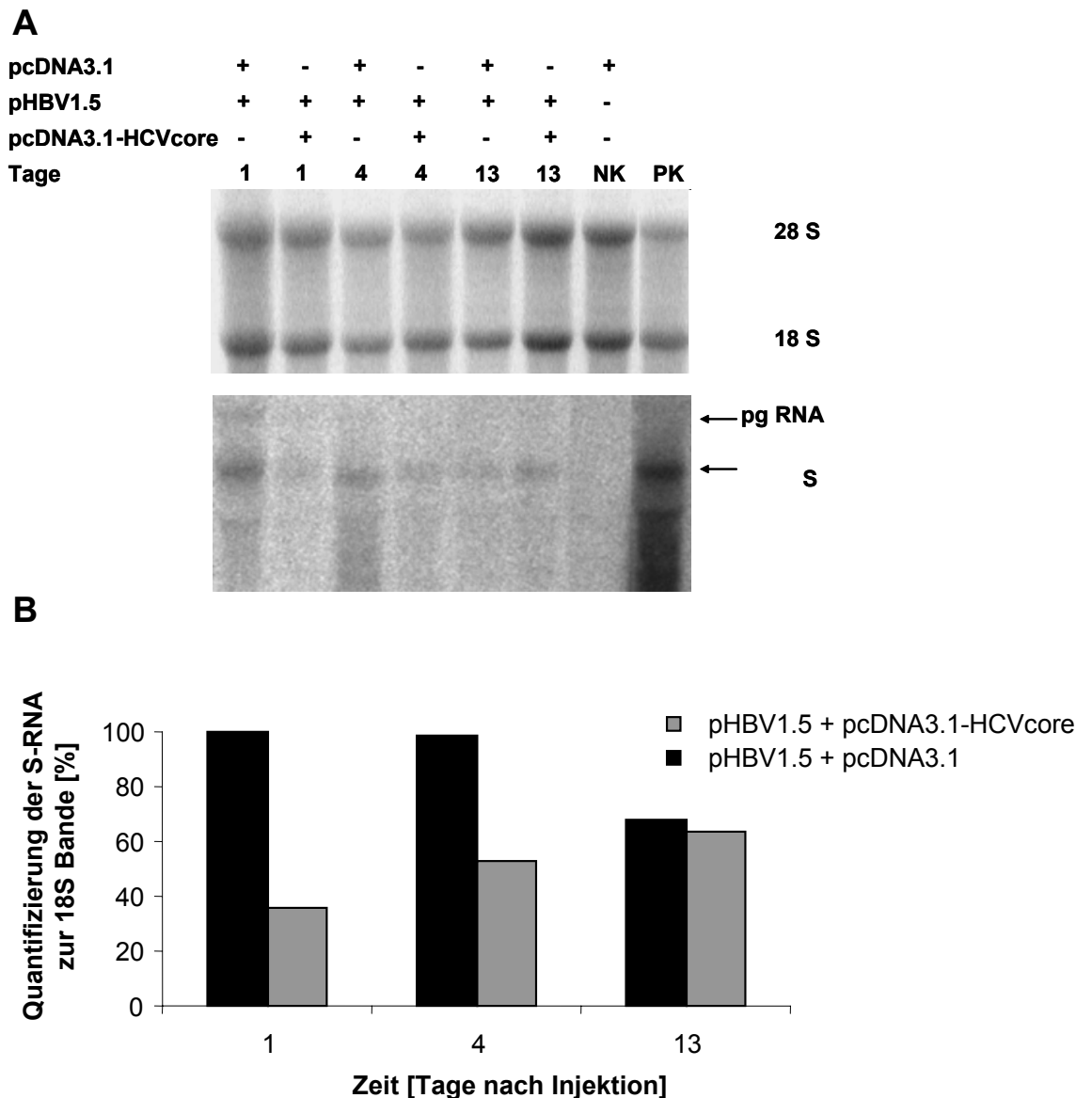
**Abb. 5.15: Vergleich der HBsAg Expression bei Kotransfektion von pHBV1.5 mit pcDNA3.1-HCVcore, pcDNA3.1, pcDNA3.1-LacZ und pcDNA3.1-HCVE1/E2 7 Tage nach Injektion.** Die HBsAg Expression wurde durch hydrodynamische Transfektion von FVB/N Mäusen mit einem HBV replikationskompetenten Plasmid (pHBV1.5: 1 µg/Tier) induziert. Gleichzeitig wurden die Mäuse mit einem HCV core kodierenden Plasmid (pcDNA3.1-HCVcore: 20 µg/Tier), pcDNA3.1-LacZ, pcDNA3.1-HCVE1/E2 und pcDNA3.1 (je 20 µg/Tier) kotransfiziert. 7 Tage nach Injektion wurde die HBsAg Expression im Serum gemessen.

Die hydrodynamische Transfektion von FVB/N Mäusen mit pHBV1.5 und anderen Expressionsplasmiden und dem Leervektor führte im Gegensatz zur Kotransfektion mit pcDNA3.1-HCVcore zu keiner signifikanten Reduktion der HBsAg Expression 7 Tage nach Injektion (Abb. 5.15).

### **5.2.2.2      Suppression der HBV Transkription bei hydrodynamisch kotransfizierten Mäusen**

Nachdem eine Suppression der HBsAg und HBeAg Expression detektiert werden konnte, wurde untersucht, inwieweit andere Intermediate der HBV Replikation beeinflusst werden. Insbesondere die Expression HBV spezifischer RNA Transkripte stand im Fokus der folgenden Untersuchungen. Hierzu wurde den unterschiedlich injizierten Tieren nach 1, 4 und 13 Tagen die Leber entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Durch Bindung einer spezifischen Sonde konnte durch Analyse im Northern Blot (Abb. 5.16A) die Transkription des HBV Plasmides nachgewiesen werden. Quantifiziert wurde die 18 S Bande im Vergleich zur Bande der S-RNA (Abb. 5.16B). Die Expression der HBV RNA war bei Tieren nach Injektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore im Vergleich zu Mäusen, die nur mit dem replikationskompetenten HBV Plasmid transfiziert wurden, bereits nach einem Tag um 60 % supprimiert. 4 Tage nach Injektion reduzierte sich die HBV-RNA Expression um 50 % (Abb. 5.16 A/B).



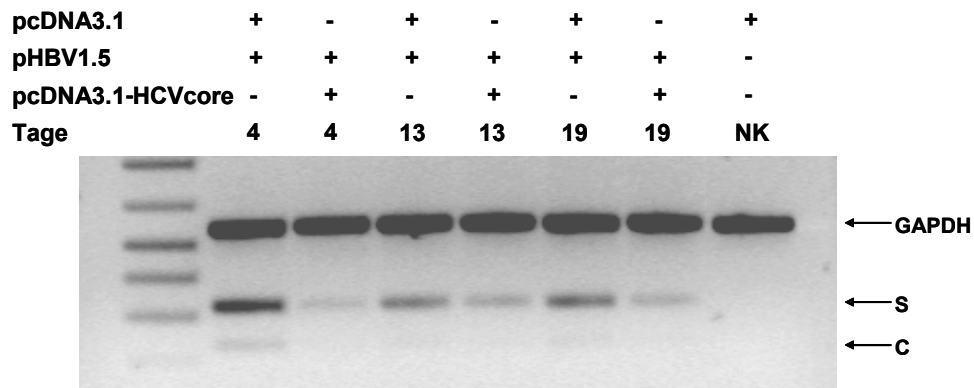


**Abb. 5.16: Analyse der Transkription des HBV Plasmides in der Leber nach transienter Injektion von FVB/N Mäusen.** **A** FVB/N Mäuse wurden mit pHBV1.5 (1 µg/Tier) durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion transfiziert. Die Lebern wurden zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert und Gesamt RNA wurde isoliert. Transkription des HBV Plasmides konnte durch Northern Blot Analyse der RNA nachgewiesen und quantifiziert **B** werden. Quantifiziert wurde die Bande der S-RNA des Blots (A unten) zur 18 S Bande des geblotteten RNA Gels[%] (A oben). Gleichzeitige Transfektion von pcDNA3.1-HCVcore (20 µg/Tier) reduziert die Transkription HBV spezifischer Transkripte.

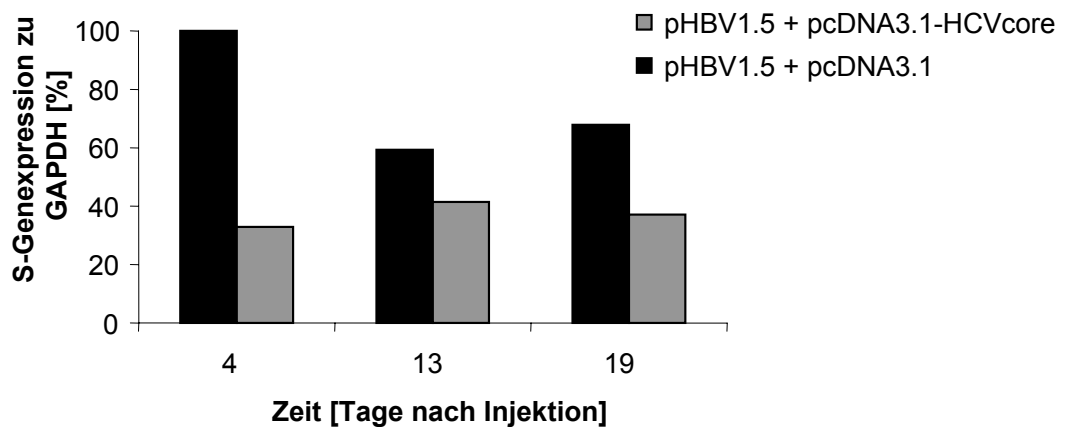
Zur Bestätigung dieser Daten wurde eine semiquantitative Triplex RT-PCR zum Nachweis der HBV-S, HBV-C und GAPDH mRNA durchgeführt. Die RT-PCR wurde mit aus Leber gewonnener RNA der unterschiedlich injizierten FVB/N Mäuse 4, 13 und 19 Tage nach Transfektion durchgeführt. Als Negativkontrolle diente die Leber-RNA einer mit NaCl/pcDNA3.1 behandelten Maus (Abb. 5.17). Vier Tage nach

Injektion war die Expression des S-mRNA bei den Tieren, die mit pHBV1.5 und dem HCV Core-Protein expremierenden Plasmid transfiziert wurden, um 65 % reduziert im Vergleich zu Tieren, denen ausschließlich pHBV1.5 Plasmid appliziert wurde. Nach 13 und 19 Tagen betrug die Suppression noch 10 – 20 % (Abb. 5.16B).

**A**



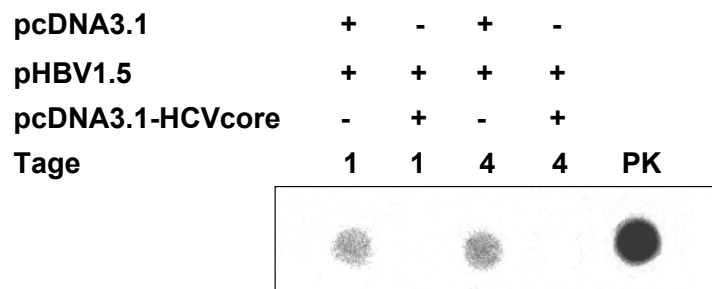
**B**



**Abb. 5.17: RT-PCR-Analyse der Expression von HBV1.5 in der Leber nach transienter Injektion in FVB/N Mäusen.** FVB/N Mäuse wurde durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion mit pHBV1.5 allein und mit pcDNA3.1-HCVcore zusammen transfiziert. Die Lebern wurden zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert und Gesamt RNA wurde isoliert. **A** Es wurden die Primer HBV-S1, HBV-S2, preC-mut-anti und praeC-Fspl in der PCR verwendet. **B** Quantifiziert wurde die Bande der S RNA im Vergleich zur GAPDH RNA. Bei gleichzeitiger Transfektion von pHBV1.5 und dem HCVcore kodierendem Plasmid wurde eine supprimierte die Transkription HBV spezifischer Transkripte.

### 5.2.2.3 Isolation enkapsidierter HBV DNA durch Immunpräzipitation und Detektion der HBV Progeny DNA durch Dot-Blot Analyse

Progeny DNA des Hepatitis B Virus wurde aus FVB/N Mäusen, denen pHBV1.5 allein oder mit dem replikationskompetenten HBV Plasmid und pcDNA3.1-HCVcore zusammen injiziert wurden, isoliert. Nach Injektion von pHBV1.5 konnte enkapsidierte DNA Kapside in den Lebern der Mäuse detektiert werden. Bei einer hydrodynamischer Kotransfektion mit dem HBV Plasmid und dem HCV Core-Protein exprimierenden Konstrukt konnte dagegen keine enkapsidierte virale DNA nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde aus Zellkultur gewonnene enkapsidierte HBV DNA verwendet.

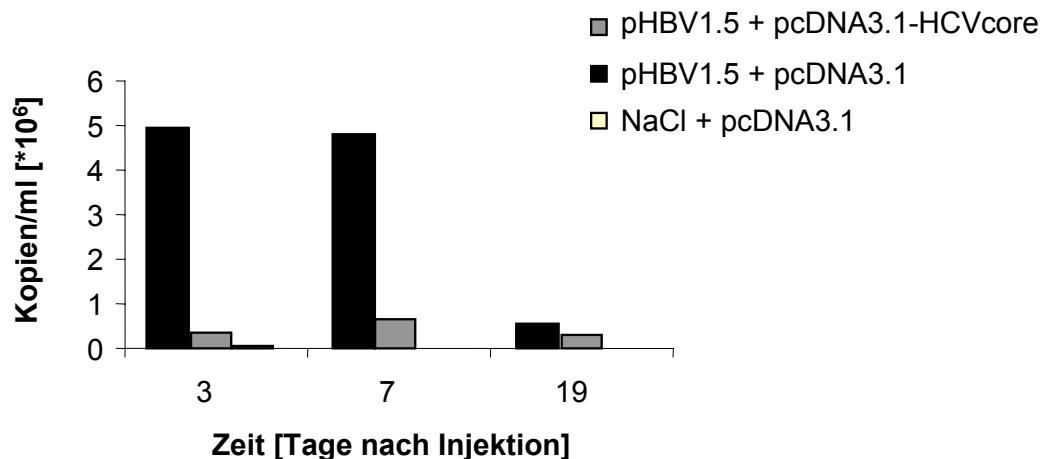


**Abb. 5.18: Detektion der HBV Kapsid DNA durch Dot-Blot Analyse.** Nachweis der Progeny HBV DNA durch Dot-Blot Analyse. Nach Immunpräzipitation der intrazellulären HBV Kapside und anschließender DNase Reaktion wurde die enkapsidierte DNA isoliert und mittels Dot-Blot auf eine Nylon Membran transferiert. Mittels Hybridisierung einer  $^{32}\text{P}$  dCTP markierten HBV spezifischen Sonde wurde virale DNA detektiert.

### 5.2.2.4 Reduktion der HBV Virionen im Serum durch Kotransfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore

Bei Patienten mit Superinfektion kann eine verfrühte HBsAg Serokonversion, dem Übergang von einer frühen in eine späte Immunantwort, beobachtet werden. Außerdem bilden bestimmte HBV Varianten oder HBV Mutationen kein nachweisbares HBeAg. In solchen Fällen ist die Detektion der HBV DNA im Serum zur Diagnostik sehr wichtig. Um das hier etablierte *in vivo* Modell bezüglich seiner Anwendbarkeit hinsichtlich der HBV DNA im Serum zu charakterisieren, wurde Serum von Tieren untersucht, die mit pHBV1.5 allein und zusammen mit HCV Core-Protein injiziert wurden. Die ins Blut abgesonderten HBV Virionen wurden isoliert und

aus dem Serum zu den angegebenen Zeitpunkten quantifiziert, wobei die Seren von 3 – 5 Tieren pro Injektionsgruppe und Zeitpunkt zusammengefasst wurden. Dabei wurde der COBAS® TaqMan HBV Test der Firma Roche verwendet bei dem DNA durch PCR mittels HBV spezifischer komplementärer Primer amplifiziert wird.



**Abb. 5.19: Detektion der HBV DNA aus dem Serum durch Taq Man PCR.** FVB/N Mäuse wurden durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion mit pHBV1.5 allein und mit pcDNA3.1-HCVcore zusammen transfiziert. HBV DNA wurde isoliert aus dem Serum isoliert und quantifiziert (COBAS® TaqMan HBV Test, Fa. Roche). Eine gleichzeitige Transfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore führt zu einer starken Reduktion der in das Blut abgegebenen HBV Virionen.

Bei der hydrodynamischen Transfektion beider Plasmide im Vergleich zur Injektion von pHBV1.5 war die Kopienzahl der HBV DNA drei Tage nach Injektion um das 15-fache reduziert. Nach sieben Tagen betrug die Suppression der HBV DNA im Serum ungefähr 80 %. 19 Tage nach Transfektion der Tiere glichen sich die Werte auf niedrigem Niveau an.

### 5.2.2.5 Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Injektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore

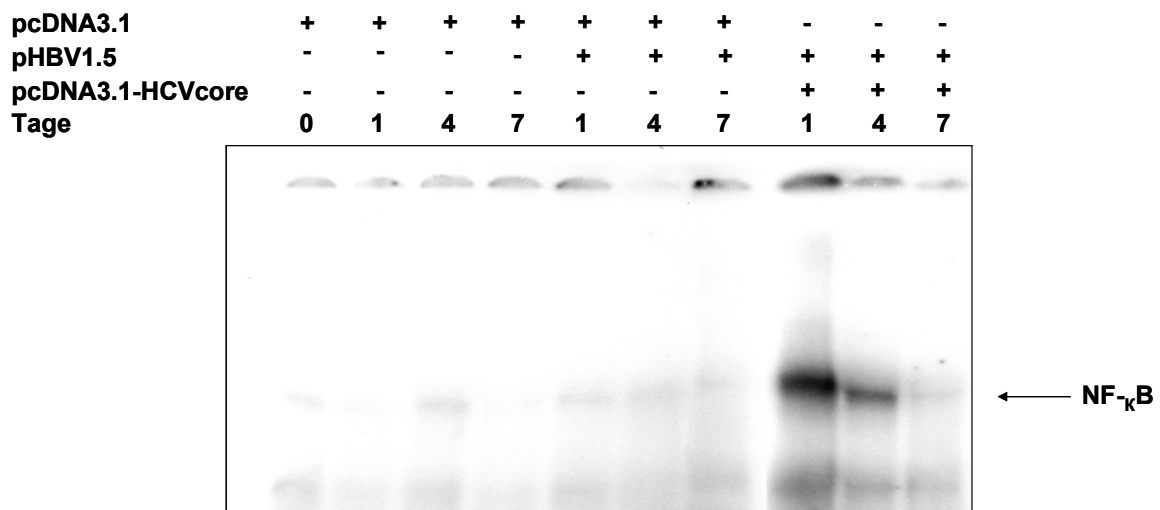
Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist in viele zelluläre Prozesse wie beispielsweise Immunzellaktivierung und –entwicklung, Streßantworten, Expression von inflammatorischen Zytokinen und die Kontrolle von Apoptose involviert. Die verschiedenen NF- $\kappa$ B-Familienmitglieder bilden hetero- und homodimerere Komplexe. Allen Mitgliedern gemein ist eine Rel Homologiedomäne, die DNA

Bindung und Proteindimerisation vermittelt. NF- $\kappa$ B liegt im inaktiven Zustand im Cytoplasma gebunden an I $\kappa$ B Proteine vor und wird nach Phosphorylierung und Degradierung von I $\kappa$ B in den Zellkern transloziert [57].

Um zu analysieren, inwieweit eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in diesem *in vivo* Maus-Modell induziert wird, wurden wie in den vorher beschriebenen Versuchen FVB/N Mäuse mit pHBV1.5 hydrodynamisch transfiziert und analog dazu zusätzlich mit dem HCV Core-Protein exprimierenden Konstrukt. Es wurden 1 Tag, 4 Tage und 7 Tage nach Injektion die Lebern entnommen, nukleäre Proteine extrahiert und mit einem doppelsträngigen <sup>32</sup>P-markierten NF- $\kappa$ B-konsensus Oligonukleotid im EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) auf die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität untersucht.

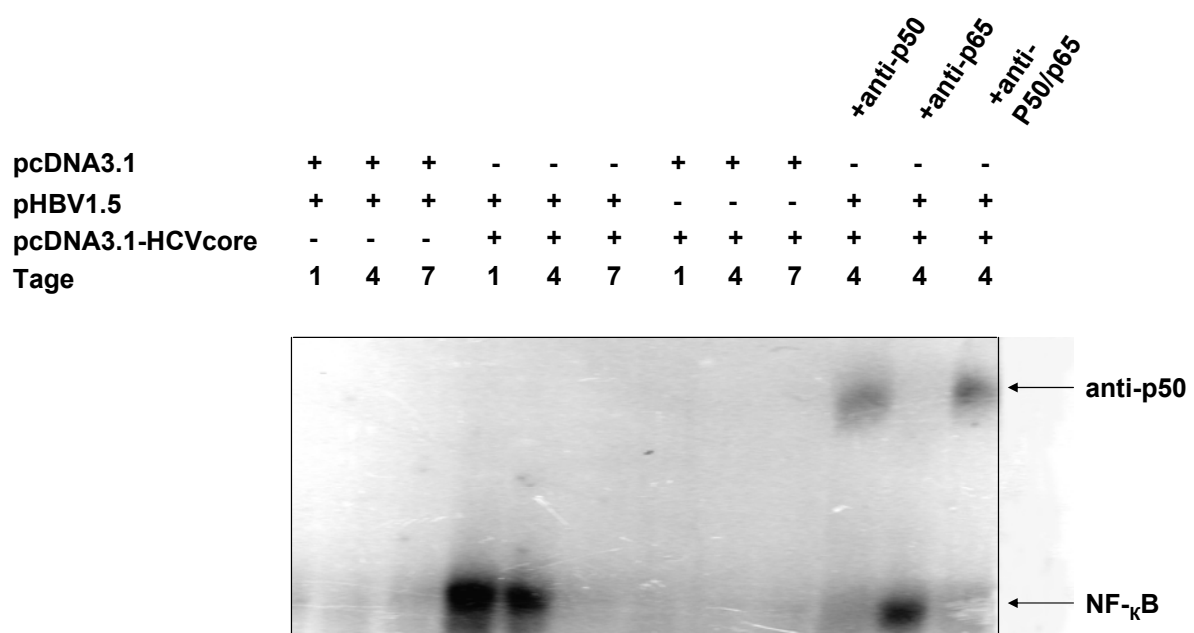
Eine Aktivierung der NF- $\kappa$ B DNA-Bindung wurde ausschließlich nach Kotransfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore induziert (Abb. 5.20). Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte bei den NaCl injizierten Kontrolltieren noch bei FVB/N Mäusen mit Injektion von pHBV1.5 allein eine NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität festgestellt werden.

Am Tag 7 nach hydrodynamischer Transfektion konnte bei keinem Tier eine DNA-Bindung der Kernproteine festgestellt werden.



**Abb. 5.20: Induktion von NF- $\kappa$ B DNA-Bindungsaktivität durch Injektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore.** FVB/N Mäuse wurde durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion mit pHBV1.5 allein und mit pcDNA3.1-HCVcore zusammen transfiziert. Zusätzlich wurden Tiere nur mit NaCl behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Kernproteinextrakt aus der Leber isoliert und mit einem NF- $\kappa$ B DNA-Oligonukleotid behandelt. Die DNA-Bindungsaktivität wurde im Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) nachgewiesen.

Um zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um einen spezifischen Effekt der Kotransfektion handelt, wurden FVB/N Mäuse mit dem HCV Core-Protein exprimierenden Konstrukt allein hydrodynamisch transfiziert. Es wurden ebenfalls Kernproteinextrakte 1 Tag, 4 und 7 Tage nach Injektion gewonnen und im EMSA auf die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität überprüft. Des weiteren wurden die Proben der Kernproteine, die vier Tage nach Injektion aus der Leber isoliert wurden, mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper inkubiert, der NF- $\kappa$ B-p50 bzw. -p65 spezifisch bindet.



**Abb. 5.21: Zusammensetzung von NF- $\kappa$ B DNA-Bindungskomplexen induziert durch pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore Cotransfektion.** FVB/N Mäuse wurde durch hydrodynamische Injektion der Schwanzvene mit pHBV1.5 bzw. pcDNA3.1-HCVcore allein und analog dazu mit beiden Plasmiden transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Kernproteinextrakt aus der Leber isoliert und mit einem NF- $\kappa$ B DNA-Oligonukleotid behandelt. Ein Supershift erfolgte mit spezifischen polyklonalen Antikörpern p50, p65 und beiden Antikörpern. Die DNA-Bindungsaktivität wurde im Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) nachgewiesen.

Wie in dem vorangegangenen Versuch war auch hier (Abb. 5.21) keine NF- $\kappa$ B DNA-Bindungsaktivität in Kernproteinextrakten nachzuweisen, die aus Lebern von Tieren isoliert wurden, die nur mit pHBV1.5 behandelt worden. Auch die Kernproteinextrakte aus den Lebern der Mäuse, die nur mit pcDNA3.1-HCVcore hydrodynamisch transfiziert wurden, wiesen keine NF- $\kappa$ B Aktivierung auf (Abb. 5.21).

Eine Stimulierung der NF- $\kappa$ B DNA-Bindung war, wie im vorherigen Versuch nur bei Tieren mit Kotransfektion festzustellen. Bei der zusätzlichen Inkubation mit p50 bzw. p65 Antikörper werden DNA-Proteinkomplexe gebunden die die jeweilige NF- $\kappa$ B Untereinheit enthalten. Dadurch vergrößert sich der Komplex und weist ein verändertes Laufverhalten in der Proteinelektrophorese auf. Entsprechend gebundene Komplexe wandern im nativen Proteingel langsamer durch das elektrische Feld.

Eine spezifische Bindung war bei der Inkubation der HBV/HCV Kernproteine mit dem spezifischen polyklonalen Antikörper p50 festzustellen. Eine Inkubation mit dem p65 Antikörper zeigte keine Veränderung des Laufverhaltens der Proben. Die Koinjektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore führte also zu einer nukleären Translokation DNA bindenden NF- $\kappa$ B p50.

### **5.2.2.6 Beeinflussung der Phosphorylierung und der Aktivierung von STAT-3**

STATs (*signal transducers and activators of transcription*) gehören zur Familie der Transkriptionsfaktoren, die u. a. durch Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden. Diese Aktivierung ist meist eine Reaktion auf extrazelluläre Signale. Tyrosin-phosphorylierte STATs bilden Dimere oder Multimere. Sie werden nach Aktivierung in den Zellkern transloziert, wo sie an spezifische DNA Sequenzen binden und die Expression von Genen regulieren. STAT-3 reguliert unter anderem die Expression von SAA, c-Jun, p300/CBP und SP1 [58].

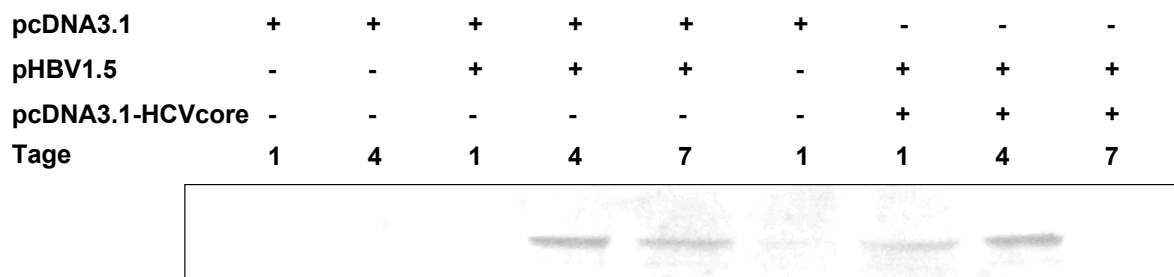
#### **5.2.2.6.1 Untersuchung der Phosphorylierung von STAT-3 durch Western Blot Analyse**

Um die Aktivierung von STAT-3 in diesem *in vivo* Modell zu analysieren, wurden FVB/N Mäuse mit pHBV1.5 allein und zusammen mit pcDNA3.1-HCVcore injiziert. Analog hierzu wurden auch Mäuse ohne Plasmid hydrodynamisch

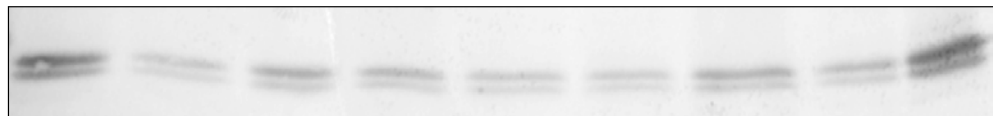
transfiziert. Es wurde 1, 4 und 7 Tage nach Injektion die Leber der injizierten Tiere entnommen und Kernproteine extrahiert.

Abb. 5.22A zeigt, dass die Injektion von pHBV1.5 allein zu einer Induktion der STAT-3 Aktivierung zwischen 4 und 7 Tagen nach Injektion führte. Dieser Effekt trat ebenfalls auf, wenn pHBV1.5 und HCV Core-Protein exprimierenden Konstrukt zusammen injiziert wurden (Abb. 5.21A). Allerdings verschob sich das Zeitfenster der STAT-3 Aktivierung zu den früheren Zeitpunkten 1 – 4 Tage nach Injektion. Bei Injektion von 0,9% NaCl fand keine STAT-3 Aktivierung statt (Abb. 5.22A).

### A



### B

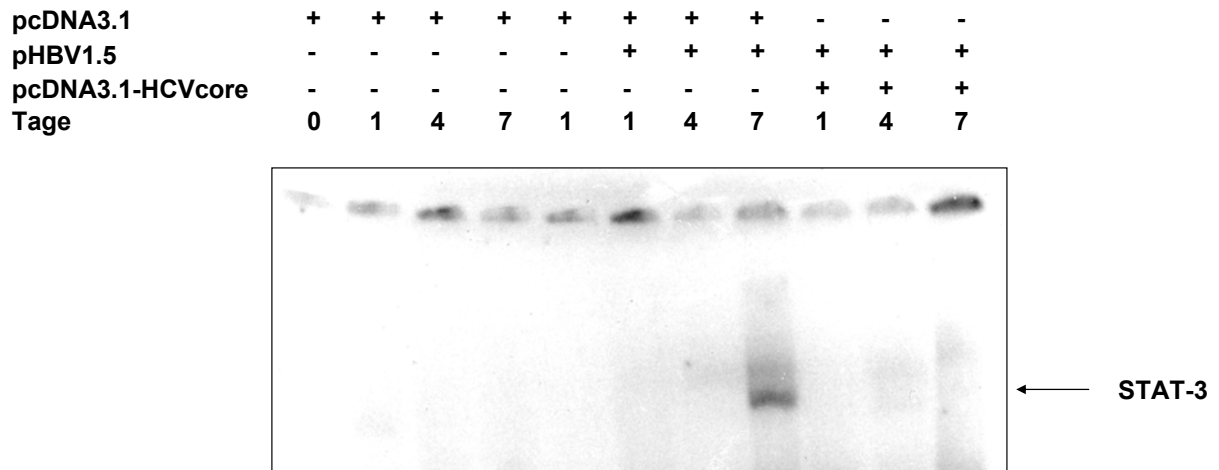


**Abb. 5.22: Nachweis von phosphoryliertem STAT-3 durch Western Blot Analyse.** **A** FVB/N Mäuse wurde durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion mit pHBV1.5 allein und mit pcDNA3.1-HCVcore zusammen transfiziert. Zusätzlich wurden Tiere nur mit NaCl behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Kernproteinextrakt aus der Leber isoliert Western Blot Analysen durchgeführt mit einem Antikörper, der phosphoryliertes STAT-3 detektiert. **B** Die Färbung mit Ponceau Rot zeigt die Beladung des Gels. Dargestellt ist der Bereich zwischen 80 und 100kDa.

#### 5.2.2.6.2 Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität von STAT-3 im Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Für die Analyse der STAT-3 DNA-Bindungsaktivität wurde mit den Kernproteinextrakten der unterschiedlich injizierten Tiere (siehe Kapitel 5.2.2.6.1) ein EMSA durchgeführt. Abbildung 5.23 zeigt, dass STAT-3 DNA Bindung ausschließlich 7 Tage nach Injektion von pHBV1.5 induziert wurde. Weder die Injektion an sich (NaCl) noch Kotransfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore induzierten STAT-3 Aktivierung.





**Abb. 5.23: Induktion von STAT-3 DNA-Bindungsaktivität durch Injektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore.** FVB/N Mäuse wurde durch hydrodynamische Schwanzveneninjektion mit pHBV1.5 allein und mit pcDNA3.1-HCVcore zusammen transfiziert. Zusätzlich wurden Tiere nur mit NaCl oder gar nicht behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Kernproteinextrakt aus der Leber isoliert und mit einem STAT-3 DNA-Oligonukleotid behandelt. Die DNA-Bindungsaktivität wurde im *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) nachgewiesen.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Untersuchung der Virusreplikation Lamivudin-resistenter Hepatitis B Virus Mutanten durch Basale Core Promoter (BCP) - und Precore (PC) – Mutationen**

#### **6.1.1 Untersuchung zur HBsAg und HBeAg Expression der Mutationen**

Bei chronischer Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV) werden häufig Virusmutanten selektiert, die wenig oder kein HBeAg bilden. Die Precore-Mutationen G1896A + C1858T exprimiert kein HBeAg. Die Mutationen A1762T/G1764A im basalen Core Promoter führt zu einer Reduktion von HBeAg Transkripten. Sowohl Precore-Mutationen (PC) wie auch Mutationen im basalen Core Promoter (BCP) sind in der 50 – 80 % der HBeAg-negativen Patienten mit chronischer HBV Infektion in Europa und Asien nachweisbar [34]. Unter Therapie mit Lamivudin (LMV) werden oft medikamentenresistente Virusstämme mit einzelner (rtM204I) oder doppelter (rtL180M + rtM204V) Mutation im Polymerase-Gen selektiert. Das YMDD-Motiv ist dabei ein Hot Spot Bereich [59]. Während einer LMV-Behandlung kommt es sowohl zu Resistenzen in HBeAg-positiven und –negativen Patienten [23].

In Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die Kombination aus HBeAg-Minus-Mutationen und LMV-Resistenz die Virusreplikation und Medikamentenresistenz beeinflusst. Hierfür wurden replikationskompetente HBV-Vektoren des Genotyps A mit verschiedenen Kombinationen aus Mutationen des Core-Bereiches (Wildtyp, PC und BCP) und Polymerase-Gens (Wildtyp, rtM204I = SM und rtL180M/M204V = DM) in Zellkultur auf Replikationsrate (Proteinexpression, HBV-RNA, Progeny-DNA, Polymerase-Aktivität, HBV-Kopienzahl im Überstand) und Medikamentenresistenz getestet.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Antigenexpression zeigten, dass alle transient transfizierten Konstrukte HBsAg exprimieren.

HBeAg ist im Serum von HBV-infizierten Patienten zu finden. Das HBeAg Niveau korreliert mit einer hohen Viruslast. Die Expression von HBeAg während einer perinatalen Infektion wird für die Förderung einer Immuntoleranz verantwortlich gemacht. Es hat ähnliche Epitope wie das Core-Protein und fungiert daher als Puffer

gegen Core [32]. Andererseits entwickelt der Wirt eine anti-HBe Immunantwort, in dessen Folge HBV infizierte Hepatozyten zerstört werden. Die anti-HBe Immunreaktion bewirkt gleichzeitig einen starken Selektionsdruck [28, 60]. Daher könnten Virusvarianten, die kein oder wenig HBeAg exprimieren begünstigt werden.

Precore-Mutation und die Kombination aus Precore-Mutation und LMV-resistenter Mutation führten in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen dazu, dass kein HBeAg sekretiert wurde (Abb. 5.2, Seite 66). Grund hierfür ist die Generation eines Stop-Codons im Precore Protein durch den Austausch von Guanin zu Adenin (G1896A) [61]. Die natürliche PC-Mutante ist assoziiert mit fulminanter Hepatitis [62, 63, 64], mit einer hohen viralen Replikation, mit chronischer Infektion [62, 65] und dem Auftreten von hepatozellulären Karzinom [66].

Die Konstrukte mit der A1762T/G1764A Mutation im basalen Core Promoter führten zu einer deutlichen Reduktion der HBeAg Expression im Mediumüberstand der transient transfizierten HuH-7 Zellen. Hunt und Mitarbeiter zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion der HBeAg Produktion um 70 % [28].

### **6.1.2 Analyse zum Einfluss der PC-Mutation in Kombination mit den LMV-resistenten Konstrukten auf die Replikationsintermediate**

Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) hat antivirale und immunmodulatorische Effekte bei HBV-Erkrankten. Allerdings ist eine Behandlung mit IFN- $\alpha$  in nur 30 % der Fälle erfolgreich [67]. Zusätzlich ist die effektive Behandlung von Patienten mit HBeAg-negativer chronischer Hepatitis B Infektion mit IFN- $\alpha$  begrenzt, da der Erfolg stark von der Dosis abhängt [68]. Daher wird die Behandlung mit Inhibitoren der reversen Transkriptase wie Lamivudin vorgezogen.

Eine Behandlung mit Lamivudin verringert die Sekretion der HBV DNA im Serum [69]. Allerdings kommt es bei 67 – 75 % der behandelten Patienten drei Jahre nach Beginn der Behandlung zur Selektion von Mutationen im Polymerase-Gen. Das Risiko einer Mutation im PC und BCP-Bereich und im Polymerase-Gen ist demzufolge während einer Lamivudinbehandlung sehr hoch.

Um die Auswirkung der Kombination von PC-Mutation oder der BCP-Mutationen mit den Lamivudin-resistenten Mutanten zu untersuchen, wurde die

Replikation nach transienter Transfektion von HuH-7 Zellen mit den unterschiedlichen Mutationskonstrukten getestet.

Vektoren mit alleiniger LMV-Resistenz zeigten eine verminderte Replikationsfähigkeit (Abb. 5.3, Seite 68 und Abb. 5.4, Seite 69). Dies entspricht *in vitro* Studien mit Lamivudinresistenten Mutanten [23, 69, 70, 71, 72]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Transkription der pregenomischen RNA zur Reduktion der Replikationskapazität der Lamivudin-resistenten Mutanten beiträgt [23, 59, 69]. Die LMV-Mutante rtL180M/rtM204V replizierten verglichen mit der Einzelmutante rtM204I effizienter. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant. Grund dafür kann ein stabilisierender Effekt der rtL180M Mutation in der B-Domäne des Polymerase-Gens auf den YMDD Loop in der C-Domäne sein. So zeigten Ono und Mitarbeiter, dass eine Doppelmutation mit Mutationen in der B- und C-Domäne des Polymerasegens zu einer erhöhten Replikation führt [59].

Die PC-Mutation per se führte zu keiner veränderten Replikation, während BCP-Mutationen die Replikation steigerte (Abb. 5.3, Seite 68 und Abb. 5.4, Seite 69). Die Kombination von LMV-resistenten Stämmen mit der PC-Mutation führte zu einer Erhöhung der Replikation. (Abb. 5.3, Seite 68 und Abb. 5.4, Seite 69). Chen und Mitarbeiter klonierten die G1896A Mutation in ein replikationskompetentes Baculovirus System. Hierbei wurde mit dem HBV Genotyp D, Subtyp ayw gearbeitet. In diesen Versuchen konnte ebenfalls eine Erhöhung der Replikationsfähigkeit der LMV-resistenten Konstrukte gezeigt werden. Da in dieser Arbeit der HBV Genotyp A (Subtyp adw2) verwendet wurde und ähnliche Ergebnisse erzielt wurden, kann man davon ausgehen, dass dieser Effekt unabhängig vom Genotyp ist [23].

Für den Anstieg der Replikation der LMV-resistenten Mutation unter Einwirkung der PC-Mutante sind unterschiedliche Faktoren verantwortlich. Das PC-Protein inhibiert die HBV DNA Synthese. Punktmutationen, die die Expression des Precore-Proteins aufheben, erhöhen die Expression der Progeny DNA [20, 73]. Sowohl die Expression pregenomischer RNA als auch von Progeny DNA erreichten bei LMV-resistenten Mutanten durch Kombination mit der PC-Mutation Wildtyp-Niveau (Abb. 5.3, Seite 68 und Abb. 5.5, Seite 71).

Zusätzlich wird die Epsilon ( $\epsilon$ ) Struktur durch die PC-Mutation stabilisiert. Das  $\epsilon$ -Signal ist ein Stem-Loop am 5'-Ende der viralen pregenomischen RNA, wo die HBV Polymerase bindet und das essentiell ist für die Enkapsidierung der HBV RNA durch die Initiierung der Assemblierung des Core-Proteins [20, 74]. Der modifizierte Stem-

Loop in der  $\varepsilon$ -Struktur der PC-Mutanten könnte die Effizienz der Enkapsidierung erhöhen. Dieses wird auch durch die Ergebnisse des Polymerase-Assays unterstützt, der eine erhöhte Aktivität bei der Kombination von PC-Mutation mit LMV-Mutation zeigt (Abb. 5.6, Seite 72).

### **6.1.3 Analyse zum Einfluss der PC-Mutation in Kombination mit den LMV-resistenten Konstrukten auf die Replikationsintermediate**

Die BCP Mutanten wiesen eine verminderte HBeAg Expression und eine erhöhte virale Replikation auf (Abb. 5.2, Seite 66 und 5.3, Seite 68). Dieses wurde auch bei HBV-Infizierten mit A1762T/G1764A Mutation im basalen Core Promoter beobachtet [28, 31, 32]. Bei HBeAg-negativen Patienten wurde die Erkrankung begleitet mit einer fulminanten Hepatitis und hepatozellulärem Karzinom (HCC) [75, 76, 77]. BCP Mutationen wurden allerdings auch in asymptomatischen Trägern und in HBeAg-positiven Patienten beobachtet [75, 78].

Auch die Kombinationsmutanten aus BCP und LMV-Resistenz replizierten stärker als der Wildtyp und die LMV-resistente Mutation allein. Zusätzlich kam es zu einer vermehrten Sekretion von HBV Virionen (Abb. 5.3, Seite 68 und Abb. 5.5, Seite 71). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die Mutation im basalen Core Promoter die Balance zwischen preC mRNA und Synthese der pregenomischen RNA verändert und die virale Produktion beeinflusst. Buckwold und Mitarbeiter beobachteten eine Abnahme der preC mRNA um das Dreifache, keine Veränderungen bei der Synthese der pregenomischen RNA und eine Erhöhung der Enkapsidierung und viralen Produktion [29]. Die BCP Mutation könnte die HBV Replikation durch eine veränderte Bindung von Transkriptionsfaktoren am Promoter erhöhen. Sie führt unter anderem zu einer reduzierten Bindung leberspezifischer Transkriptionsfaktoren, die in einer verminderten Pre-C/C mRNA Transkription und verringerter Precore-Protein Expression resultieren [28].

Veränderungen der Nukleotide A1762T und G1764A führen zusätzlich durch die Überlappung des HBV-Genoms zum Austausch von Nukleotiden und damit verbundenen Änderungen in der Aminosäureabfolge im X-Gen (xK130M und xV131I). Dieses kann zu einer Modifizierung der Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren führen [24].

Einige Publikationen weisen auf den Zusammenhang zwischen BCP Mutationen und Hepatokarzinogenese hin [79, 80]. Genauso werden Mutationen im X-Gen des Hepatitis B Virus in Patienten mit HCC beobachtet und implizieren eine mögliche Rolle in der Karzinogenese [81].

Die Mutationen im basalen Core Promoter treten in der späten HBeAg-positiven Phase im Übergang zum anti-HBe Stadium der Infektion, vorwiegend in Genotyp A auf [24]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Konstrukte mit BCP-Mutation die Replikationseffizienz im Vergleich zu dem Wildtyp und dem Konstrukt mit PC-Mutation direkt erhöhen. Die klinischen Beobachtungen werden durch diese molekularen Analysen unterstützt.

### **6.1.4 Untersuchung der Konstrukte auf Medikamentenresistenz**

Therapie mit Interferon  $\alpha$  ist bei weniger als 40 % der Patienten erfolgreich. Die Wirkung von IFN- $\alpha$  ist sowohl antiviral als auch immunmodulatorisch. Der Grund für dieses nicht Ansprechen ist allerdings unklar [82]. IFN- $\alpha$  erhöht den Druck auf Immunelimination und damit auch den Selektionsdruck, dieses führt zu Mutationen. Allerdings kommt es nicht zu einer Häufung von Punktmutationen bestimmter Basen [60].

Aufgrund der relativ niedrigen Erfolgsrate einer IFN- $\alpha$  Therapie und dem begrenzten Einsatz ist der Einsatz von Inhibitoren der reversen Transkriptase eine Alternative [69]. Die Behandlung mit Lamivudin führt zu einer verminderten Sekretion der HBV DNA im Serum, übt allerdings auch einen hohen Selektionsdruck auf das Polymerase-Gen aus. Schon ein Jahr nach Behandlungsbeginn können in 14 – 39 % der Patienten Lamivudin-resistente HBV Mutationen festgestellt werden. 67 – 75 % der Behandelten entwickeln LMV-Mutationen 3 Jahre nach Beginn einer Lamivudin-Therapie [59]. Die häufigsten Mutationen sind im konservierten YMDD-Motiv. Es treten neben einer Einzelmutation (rtM204I) auch Doppelmutationen (rtL180M + rtM204V) auf, die wie schon in den vorigen Versuchen dieser Arbeit beschrieben eine Reduktion der Replikation gegenüber dem Wildtyp aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die neun Konstrukte mit verschiedenen Kombinationen aus Mutationen auf Medikamentenresistenz gegenüber Lamivudin getestet werden. Zusätzlich sollte auch die Sensitivität gegenüber Adefovir

beobachtet werden. Adefovir (PMEA) kann alternativ zu Lamivudin eingesetzt werden. Es handelt sich hierbei um ein Nukleosidanalogen, das gegen HIV, Herpesviren und Hepadnaviren eingesetzt wird. Adefovir reduziert die HBV DNA im Serum und induziert in 20 % der Infizierten eine Serokonversion 12 Wochen nach Behandlungsbeginn.

### **6.1.4.1 Untersuchung der Mutationskonstrukte auf Lamivudinsensitivität**

Konstrukte mit Lamivudin-Resistenz (rtM204I und rtL180M + rtM204V) wiesen eine Resistenz gegenüber Lamivudin auf. Diese Resistenz wurde auch nicht durch Kombination mit der PC-Mutation beeinflusst, obwohl hierdurch die Replikationsrate auf Wildtypniveau angehoben wurde (Abb. 5.8, Seite 74/75). *In vivo* wurde teilweise eine reduzierte Sensitivität bei PC-LMV-Mutationen gegenüber Lamivudin beobachtet [83]. Chen und Mitarbeiter konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls keine Veränderung der Sensitivität gegenüber Lamivudin nachweisen [23]. Gleiche Ergebnisse ergaben klinische Langzeitstudien mit HBeAg-negativen Patienten [84].

Die Kombination der BCP-Mutation mit der den LMV-resistenten Mutationen führte ebenfalls zu keiner Veränderung der LMV-Sensitivität. Die Replikationsrate war allerdings signifikant höher im Vergleich zur Kombination mit der Wildtyp-Polymerasesequenz (Abb. 5.8, Seite 74/75).

### **6.1.4.2 Untersuchung der Mutationskombinationen auf Adefovirsensitivität**

Alle neun untersuchten Konstrukte waren gegenüber Adefovir vergleichbar empfindlich, was auch Studien an Patienten belegen (Abb. 5.9, Seite 76) [85]. Adefovir war genauso erfolgreich bei der Wildtypvariante wie auch bei den LMV-resistenten Mutationen. Perrillo und Mitarbeiter zeigten dieses an Langzeitstudien mit Patienten, die LMV-resistente Mutationen aufwiesen [86]. Zusätzlich konnte bei Langzeitbehandlungen mit Adefovir ein geringeres Risiko der Entwicklung von Mutationen beobachtet werden [27].

Precore und basale Core Promoter Mutationen können demnach die Replikationsrate von LMV-resistenten Stämmen erhöhen, ohne die Medikamentenresistenz zu beeinflussen. Die engmaschige virologische Beobachtung von HBeAg-negativen Patienten unter LMV-Therapie ist daher empfehlenswert. Adefovir scheint somit eine effektive therapeutische Option zu sein, wenn Kombinationsmutationen im Core- und Polymerase-Gen auftreten.



## **6.2 Analyse der Suppression der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein**

Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus zählen zu den häufigsten Verursachern von Lebererkrankungen. Obwohl beide Viren unterschiedlichen Familien angehören und verschiedene Replikationsmechanismen haben, treten sie aufgrund ähnlicher Übertragungswege über Blut oder sexueller Kontakte zusammen auf. HBV/HCV Superinfektionen häufen sich in Gegenden, in denen beide Viren endemisch sind und zwischen Personen, die ein hohes Risiko einer perinatalen Infektion tragen [55]. Patienten mit einer HBV/HCV Superinfektion sind oft HBsAg-negativ. Die HBV DNA und Antikörper gegen das Hepatitis B Core Antigen (anti-HBc) können allerdings detektiert werden [54]. Bei diesen Patienten führt die Infektion zu einer erhöhten Leberschädigung und gehäuft zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) [87]. Studien in Südafrika zeigen, dass eine chronische HBV Infektion eine weitaus größere Rolle in der HCC-Entwicklung spielt als eine persistente HCV Infektion. Der Nachweis von HBsAg im Serum ist assoziiert mit einem ca. 23 fachen Anstieg des HCC Risikos, wobei die HCV Infektion (nachgewiesen durch Marker wie anti-HCV oder der HCV RNA) zu einem 6 fachen Anstieg der Entwicklung eines HCCs führt. Bei einer Superinfektion kann ein synergistischer Effekt beobachtet werden [88].

### **6.2.1 Suppression der HBeAg und HBsAg Expression durch das HCV Core-Protein *in vitro***

Die HCV Superinfektion führt aber auch zu einer Suppression der HBV Replikation und einer erhöhten *Seroclearance* von HBeAg und HBsAg [56]. Die molekularen Mechanismen dieses suppressiven Effektes sind weitgehend unklar. *In vitro* Studien zeigten eine Unterdrückung der HBV Replikation speziell durch das Core-Protein des HCV [35, 89].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Zellkultursystem zur Untersuchung der Beeinflussung der HBV Replikation durch das Core-Protein des Hepatitis C Virus etabliert werden. Das Core-Protein des HCV ist sowohl nukleär wie auch cytoplasmatisch lokalisiert. Es konnte drei Tage nach transienter Transfektion die

Lokalisation des Core-Proteins im Nukleus nachgewiesen werden. Die nukleäre Lokalisation scheint dabei essentiell für den inhibierenden Effekt des HCV Core-Proteins auf die HBV Antigen Expression und die Replikation [89].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das HCV Core-Protein nach transienter Transfektion von HuH-7 Zellen sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 5.10, Seite 79). Die Kotransfektion von dem HCV Core Expressionsplasmid mit dem replikationskompetenten HBV wt Plasmid führte zu einer signifikanten Suppression der HBsAg und HBeAg Expression (Abb. 5.11, Seite 81).

### **6.2.2 Reduktion der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein *in vivo***

Es sollte ein *in vivo* Mausmodell entwickelt werden, um die Suppression der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein zu untersuchen. Hierzu wurden Wildtypmäuse (FVB/N) hydrodynamisch über die Schwanzvene mit dem linearisierten HBV bzw. HCV Core Expressionsplasmid transfiziert. Durch Injektion der Konstrukte in die Schwanzvene kann die Expression HBV spezifischer Proteine und RNA in Hepatozyten induziert werden [53].

Durch dieses Vorgehen konnte eine HCV Core-Protein abhängige Suppression aller untersuchten HBV Replikationsmarker *in vivo* gezeigt werden (Abb. 5.14, Seite 84; Abb. 5.16, Seite 87; Abb. 5.17, Seite 88; Abb. 5.18, Seite 89 und Abb. 5.19, Seite 90).

Die molekularen Mechanismen, die einer HCV Core-Protein abhängigen Suppression der HBV Replikation zugrunde liegen, sind allerdings bis heute nur wenig verstanden.

Eine mögliche Erklärung für diese Effekte könnte die Interaktion von HCV Core-Protein mit dem HBx-Protein sein. HBx ist ein multifunktionelles Protein, das essentiell für den viralen Replikationszyklus und für die Interaktion zwischen Virus und Wirt ist [90, 91, 92]. HBx kann virale und zelluläre Promotoren aktivieren, p53 und Signaltransduktionswege in der Zelle beeinflussen [93, 94]. HBx wird ebenfalls mit dem gehäuften Auftreten von HCC im Verlauf einer HBV Infektion in Zusammenhang gebracht [3].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HCV Core-Protein die Expression HBV spezifischer Proteine um das 20 fache reduzieren kann. Die Expression HBV spezifischer Transkripte war dagegen nur um das 2 – 4 fache vermindert (Abb. 5.16, Seite 87; Abb. 5.17, Seite 88 und Abb. 5.19, Seite 90). Es muss daher von verschiedenen kumulativ wirkenden Mechanismen der HBV Replikationsrepression ausgegangen werden.

Chen und Mitarbeiter zeigten, dass das HCV Core-Protein mit HBx komplexiert. Ist HBx mutiert, kann kein suppressiver Effekt auf HBV Mutationen nachgewiesen werden [10]. Diese Tatsache könnte für die posttranskriptionelle, HCV Core-Protein vermittelte Inhibition der HBV Genexpression verantwortlich sein.

Zusätzlich könnte das HCV Core-Protein einen Komplex mit der HBV Polymerase bilden und so eine Bindung des Pol-Proteins mit dem  $\epsilon$ -Signal unterbinden [86]. Da die Bindung der HBV Polymerase mit dem  $\epsilon$ -Signal eine Vorbedingung für die Enkapsidierung der pregenomischen RNA ist, kann man davon ausgehen, dass das HCV Core-Protein die Verpackung der pregenomischen RNA in das Nukleokapsid inhibiert.

### **6.2.2.1 Mögliche Bereiche des Hepatitis C Virus Core-Proteins für den suppressiven Effekt auf die HBV Replikation**

*In vitro* Versuche von Shih und Mitarbeitern zeigten, dass die Phosphorylierung des HCV Core-Proteins für den suppressiven Effekt essentiell ist. Die Phosphorylierung des HCV Core-Proteins wird durch die Protein Kinase A (PKA) und Protein Kinase C (PKC) durchgeführt. Durch PKA und PKC wird somit auch die Unterdrückung der HBV Genexpression und Replikation reguliert. Zum einen könnte die Phosphorylierung die Affinität trans-suppressiver Domänen für Transkriptionsfaktoren oder der Enkapsidation durch die Generation negativ geladener Aminosäuren erhöhen. Zum anderen beeinflusst die Phosphorylierung die Anpassung von suppressiven Domänen, wodurch die Affinität des Core-Proteins erhöht wird [35].

Ser<sup>53</sup> und Ser<sup>116</sup> sind essentiell für eine potentielle Phosphorylierung durch PKA und Ser<sup>53</sup> und Ser<sup>99</sup> für PKC und damit auch wichtig für den suppressiven Effekt des Core-Proteins. Die Zugabe von Protein Kinase Inhibitoren verringerten auch die

suppressiv Aktivität des HCV Core-Proteins. Allerdings scheint die Phosphorylierung nicht wichtig für den Transport des Core-Proteins in den Kern zu sein, da Mutationen in den Regionen, die wichtig für die Phosphorylierung sind trotzdem zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern führen.

Chen und Mitarbeiter machten Versuche mit unterschiedlichen Mutationen von Arginin-Aminoresten (Arg<sup>101</sup>, Arg<sup>104</sup>, Arg<sup>113</sup>, Arg<sup>114</sup>, Arg<sup>115</sup> und Arg<sup>117</sup>) des HCV Core-Proteins. Arg<sup>117</sup> hat keinen Einfluss auf den suppressiven Effekt des Core-Proteins. Arg<sup>101</sup> ist involviert in die Phosphorylierung des Ser<sup>99</sup> durch PKC. Arg<sup>104</sup> blockiert die Enkapsidierung der HBV DNA hat aber keinen Effekt auf die HBV Genexpression. Nur bei einer Mutation von Arg<sup>113</sup>, Arg<sup>114</sup> und Arg<sup>115</sup> geht der suppressive Effekt des Core-Proteins verloren. Daher wird angenommen, dass die Aminosäuren zwischen 101 und 122 eine wichtige Domäne für die Suppressionsaktivität des HCV Core-Proteins auf die HBV Transkription und virale Enkapsidation ist. In der N-Terminalen Region des HCV Core Polypeptides befinden sich drei unabhängige NLS (*nuclear localisation sequence*). Mutationen in den NLS bewahrten allerdings den suppressiven Effekt auf die HBV Replikation [10].

### **6.2.3 Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktionswege für den inhibitorischen Effekt auf die HBV Replikation**

Die intrazellulären Signaltransduktionswege, die die Inhibition der HBV Replikation vermitteln, können mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten *in vivo* Maus-Modell untersucht werden. Insbesondere die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und von STAT-3 wurde genauer analysiert.

NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden kann. So können TNF und Interleukin-1 NF- $\kappa$ B aktivieren, in dem sie I $\kappa$ B $\alpha$  degradieren [95]. Eine Stimulation durch LPS führt zu einer NF- $\kappa$ B p50 Aktivierung [96]. Unter anderem sind aber auch virale Proteine mit onkogenem Potential wie das Tax Protein des HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus type 1*) [97] oder das LMP-1 Protein des Epstein-Barr virus [98] in der Lage NF- $\kappa$ B aktivieren. Für das HBx-Protein werden ähnliche Charakteristika beschrieben [94].

Aktives NF- $\kappa$ B setzt sich zusammen aus homo- oder heterodimeren Proteinen, die beteiligt sind an der Bindung konservierter DNA. NF- $\kappa$ B ist im Cytoplasma durch

inhibitorische Proteine wie I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$ . Nach proteolytische Degradation von I $\kappa$ B Proteinen, transloziert aktives NF- $\kappa$ B in den Zellkern [99]. Dieses führt zur Freisetzung von Komplexen der NF- $\kappa$ B Familie wie p65 oder RelA/p50 der Aktivierung ihrer transkriptionellen Aktivität [100].

### **6.2.3.1 p50 Aktivierung durch Koinjektion von HBV und HCV Core Expressionsvektor**

Interessanterweise führte nur die Kotransfektion mit pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50 (Abb. 5.21, Seite 92). In *in vitro* Versuchen konnte eine Interaktion von dem HCV Core-Protein mit dem HBx-Protein nachgewiesen werden [35]. Das HBx-Protein kann als Aktivator von NF- $\kappa$ B wirken, in dem es die inhibitorische Untereinheit I $\kappa$ B $\alpha$  degradiert [94]. Die Komplexbildung von HCV Core-Protein mit dem HBx könnte zu einer Modulation des NF- $\kappa$ B Signalweges und einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50 führen.

RelB, c-Rel und p65 beinhalten ein Transaktivierungsdomäne (TAD), die im C-Terminus liegen und notwendig sind für die Transaktivierung durch diese Proteine. Den Homodimeren p52 und p50 fehlt diese TAD und sie haben daher keine Möglichkeit der Transaktivierung. Daher führt die Bindung der p52/p50 Homodimere an die  $\kappa$ B-Bindungsstelle von Zellen zur Repression der Genexpression [101]. Zudem zeigen p50 Knockout-Mäuse eine vermindert Immunglobulin Produktion und eine mangelhafte Immunantwort [102].

Die nukleäre Translokation von p50 scheint für eine ausreichende Immunantwort von Bedeutung zu sein. Die Koinjektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore könnte durch immunmodulatorische Mechanismen zur Suppression der HBV Replikation durch das HCV Core-Protein führen.

Weiterhin könnte die Koexpression von HBV Replikationsintermediaten und HCV Core-Protein zu einer synergistischen Erhöhung der ROS Produktion führen und damit NF- $\kappa$ B aktivieren. Chronische HBV und HCV Infektion ist assoziiert mit einer erhöhten Produktion von ROS (*reactive oxygen species*). Ein hohes intrazelluläres Niveau von ROS korreliert mit oxidativem Stress. ROS kann Signaltransduktionskaskaden durch STAT-3 und NF- $\kappa$ B aktivieren [103]. Sowohl für das HBx Protein als auch für HCV NS5A konnte eine Aktivierung zellulärer

Transkriptionsfaktoren durch oxidativen Stress gezeigt werden. HBx induziert oxidativen Stress durch eine direkte Assoziation mit den Mitochondrien, was zu einer Erhöhung von ROS führt [104]. Bei Patienten, die mit chronischer Hepatitis C infiziert sind, kann ebenfalls eine Zunahme von ROS beobachtet werden, was zu einer Störung des Calciumgleichgewichtes führen kann [105].

### **6.2.3.2 STAT-3 Aktivierung durch pHBV1.5 Injektion und zusätzlicher Transfektion von pcDNA3.1-HCVcore**

Der Transkriptionsfaktor STAT-3 wird als Antwort extrazellulärer Signale wie Zytokine und Wachstumsfaktoren durch Phosphorylierung aktiviert. Aktivierte STATs bilden Dimere oder Multimere und werden in den Zellkern transportiert, wo sie spezifisch DNA Sequenzen binden und die Expression von Genen regulieren [58]. Interleukin-6 (IL-6) ist ein potentieller STAT-3 Aktivator. Hierbei handelt es sich um ein Zytokin, das nach Bindung seines spezifischen Rezeptors gp80 mit dem signaltransduzierenden Transmembranrezeptor gp130 komplexiert [106].

Durch aktiviertes gp130 werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden initiiert [107]. Der Rezeptor besitzt keine Proteinkinaseaktivität, ist aber konstitutiv mit Kinasen der Janusfamilie (JAK) assoziiert. Die Janus Tyrosinkinase werden durch gp130 Dimerisierung aktiviert; es kommt zu deren Autophosphorylierung und schließlich zur Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen gp130 Domänen [108]. Wird das Tyrosin Y767 phosphoryliert, bindet STAT-3, und wird von den assoziierten Januskinasen phosphoryliert. STAT-3 dissoziiert vom Rezeptor, homodimerisiert und transloziert in den Kern [109].

Im Western Blot konnte eine Phosphorylierung von STAT-3 bei Tieren mit Injektion von pHBV1.5 allein zwischen 4 und 7 Tagen nachgewiesen werden. Die Aktivierung war bei koinjizierten Mäusen zeitlich verschoben. STAT-3 wurde bei HBV/HCV Core-Protein kotransfizierten Tieren schon nach 1 – 4 Tagen nach Injektion aktiviert (Abb. 5.22, Seite 94 und Abb. 5.23, Seite 95).

Die Aktivierung von STAT-3 erfolgt durch spezifische Tyrosinphosphorylierung, Dimerisierung und Translokation in den Kern. Studien zeigten, dass eine Aktivierung von STAT-3 durch die Phosphorylierung von Tyrosin 705 (Y705) zum Transport in den Nukleus führt [110]. Die Koinjektion von pcDNA3.1-

HCVcore und pHBV1.5 führte offensichtlich zu einer veränderten Kinetik des HBV induzierten Phosphorylierungsmusters. Ursächlich für die HBV induzierte STAT-3 Aktivierung könnte das HBx Protein sein.

HBx führt zu einer Aktivierung von STAT-3 induziert durch den Jak1-STAT Signaltransduktionsweg. HBx modifiziert die Jak-STAT Interaktion. Dieser Effekt wird in direktem Zusammenhang zu Leberzirrhose und HCC gebracht [111].

Eine andere Ursache der STAT-3 Aktivierung könnte die schon im Zusammenhang mit NF- $\kappa$ B diskutierte HBV abhängige Induktion reaktiver Sauerstoff Spezies sein.

Interessanterweise konnte STAT-3 DNA-Bindung ausschließlich 7 Tage nach Injektion von pHBV1.5 nachgewiesen werden (Abb. 5.23, Seite 95). Blindenbacher und Mitarbeiter beschreiben eine Inhibition des Jak1-STAT Signalweges in Leberzellen von HCV Core transgenen Mäusen durch eine erhöhte Degradierung von STATs im Zellkern [112]. Somit könnte in HBV/HCV Core-Protein kotransfizierten Mäusen das phosphorylierte STAT-3 in den Zellkern transloziert werden. Durch das kernlokalisierte HCV Core-Protein wird STAT-3 allerdings degradiert, wodurch eine DNA-Bindung von STAT-3 nur bei pHBV1.5 injizierten Tieren beobachtet werden kann.

Durch die Kotransfektion von pHBV1.5 und pcDNA3.1-HCVcore konnte *in vitro* die Suppression der HBsAg und HBeAg Expression nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vivo* Mausmodell etabliert, um den Effekt des HCV Core-Proteins auf die HBV Replikation zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen eine spezifische Suppression der HBV Expression und Replikation. Zusätzlich erlaubt dieses Modell die Auswirkung der Kotransfektion auf unterschiedliche Signaltransduktionswege wie NF- $\kappa$ B und STAT-3. Die hydrodynamische Transfektion von pHBV1.5 und dem HCV Core Expressionsplasmid führt zu einer spezifischen Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50. Durch die Kotransfektion tritt eine vorzeitige Phospho-STAT-3 Aktivierung ein allerdings keine DNA-Bindungsaktivität.

Im Weiteren soll in diesem Modell der genaue Bereich des HCV Core-Proteins, der für den suppressiven Effekt und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und STAT-3 verantwortlich ist, durch verkürzte Plasmidkonstrukte eingegrenzt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] **Blumberg BS.** Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:7121 – 7125
- [2] **Lee MW.** Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 1997; 337:1733 – 1745
- [3] **Anzola M.** Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses/proteins in hepatocarcinogenesis. *J Vir Hep.* 2004; 11:383 – 393
- [4] **Ganem D, Varmus HE.** The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56:651 – 693
- [5] **Nassal M.** Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology.* 1999; 42:100 – 116
- [6] **Moolla N, Kew M, Arbuthnot P.** Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Vir Hep.* 2002; 9:323 – 331
- [7] **Nassal M, Schaller H.** Hepatitis B virus replication – an update. *J Vir Hep.* 1996; 3:217 – 225
- [8] **Kramvis A, Kew MC.** The core promoter of hepatitis B virus. *J Vir Hep.* 1999; 6:415 – 427
- [9] **Ganem D, Prince AM.** Hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004; 350:1118 – 1129
- [10] **Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM, Hsu MJ, Chao CH, Wang SH, You LR, Wu Lee YH.** Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem.* 2003; 278:591 – 607
- [11] **Lau JY, Wright TL.** Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet.* 1993; 342:1335 – 1340



- [12] **Tiollais P, Pourcel C, Dejean A.** The hepatitis B virus. *Nature*. 1985; 317:489 – 495
- [13] **Kuroki K, Eng F, Ishikawa T, Turck C, Harada F, Ganem D.** gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem*. 1995; 270:15022 – 15028
- [14] **Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, Zentgraf H.** Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol*. 2001; 307:183 – 196
- [15] **Nassal M, Schaller H.** Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol*. 1993; 1:221 – 228
- [16] **Feitelson M.** Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5:275 – 301
- [17] **Knaus T, Nassal M.** The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem loop structure that is critical for its function. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21:3967 – 3975
- [18] **Doo E, Liang TJ.** Molecular anatomy and pathophysiologic implications of drug resistance in hepatitis B virus infection. *Gastro*. 2001; 120:1000 – 1008
- [19] **Lok AS, McMahon BJ.** Chronic hepatitis B. *Hepat*. 2001; 34:1225 – 1241
- [20] **Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR.** Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J Vir*. 1997; 71:345 – 353
- [21] **Moradpour D, Wands JR.** Understanding hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 1995; 332:1092 – 1093
- [22] **Farrell GC.** Clinical potential of emerging new agents in hepatitis B. *Drugs*. 2000; 60:701 – 710
- [23] **Chen RYM, Edwards R, Shaw T, Colledge D, Delaney WE, Isom H, Bowden S, Desmond P, Locarnini S.** Effect of the G1896A precore mutation

- on drug sensitivity and replication yield of lamivudine-resistant HBV in vitro. *Hepat.* 2003; 37:27 – 35
- [24] **Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A.** The hepatitis B virus and common mutants. *Sem Liv Dis.* 2003; 23: 5 – 20
- [25] **Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang S, Zhang D, Lu Z, Wang Y.** Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Gastr Hepat.* 2003; 18:1353 – 1357
- [26] **Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wurstthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F.** Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastro.* 2004; 126:1750 – 1758
- [27] **Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S.** Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastro.* 2003; 125:292 – 297
- [28] **Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condeay LD.** Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepat.* 2000; 31:1037 – 1044
- [29] **Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH.** Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Vir.* 1996; 70:5845 – 5851
- [30] **Laras A, Koskinas J, Hadziyannis SJ.** In vivo suppression of precore mRNA synthesis is associated with mutations in the hepatitis B virus core promoter. *Virology.* 2002; 295:86 – 96
- [31] **Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH.** Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Vir.* 1999; 73:1239 – 1244

- [32] **Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, Khan N, Trépo C, Wands J, Tong S.** Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Vir.* 2003; 77:6601 – 6612
  
- [33] **Leung, NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent, JC, Edmundson S, Condeary LD, Chien RN.** Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepat.* 2001; 33:1527 – 1532
  
- [34] **Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, Carey W, Brown RS, Luketic VA, Terrault N, Lok ASF.** Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepat.* 2003; 38:619 – 628
  
- [35] **Shih CM, Chen CM, Chen SY, Lee YHW.** Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J Vir.* 1995; 69:1160 – 1171
  
- [36] **Miller RH and Purcell RH.** Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 80:2057 – 2061
  
- [37] **Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi, S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Choo YL, Houghton M, Kuo G.** Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:6547 – 6549
  
- [38] **Major ME, Feinstone SM.** The molecular virology of hepatitis C. *Hepat.* 1997; 6:1527 – 1538
  
- [39] **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 4902:359 – 362

- [40] **Bartenschlager R, Lohmann V.** Replication of hepatitis C virus. *J Gen Vir.* 2000; 81:1631 – 1648
- [41] **Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N.** The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:6104 – 6108
- [42] **Major ME, Feinstone SM.** The molecular virology of hepatitis C. *Hepat.* 1997; 6:1527 – 1538
- [43] **Shoji I, Suzuki T, Sato M, Aizaki H, Chiba T, Matsuura Y, Miyamura T.** Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein. *Virology.* 1999; 254:315 – 323
- [44] **You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM.** A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication *J Vir.* 2004; 78(3):1352 – 66
- [45] **Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J.** Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:8738 – 8743
- [46] **Ali N, Siddiqui A.** The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:2249 – 2254
- [47] **Braasch DA, Corey DR.** Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochem.* 2002; 41:4503 – 4510
- [48] **Lobigs M, Lee E.** Inefficient signalase cleavage promotes efficient nucleocapsid incorporation into budding flavivirus membranes. *J Vir.* 2004; 78:178 – 186

- [49] **Brown-Driver V, Eto T, Lesnik E, Anderson P, Hanecak C.** Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Drug Dev.* 1999; 9:145 – 154
- [50] **Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV.** Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:13825 – 13830
- [51] **Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV.** Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science.* 1999; 284:825 – 829
- [52] **Chisari FV.** Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Micro Immun.* 1996; 206:149 – 173
- [53] **Klein C, Bock CT, Wedemeyer H, Wüstefeld T, Locarnini S, Dienes HP, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C.** Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastro.* 2003; 125:9 – 18
- [54] **Bréchot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchot P.** Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”? *Hepat.* 2001; 34:194 – 203
- [55] **Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G.** Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med.* 1999; 341:22 – 26
- [56] **Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H.** Effect of acute self-limited hepatitis C virus (HCV) superinfection on hepatitis B virus (HBV)-related cirrhosis. Virological features of HBV-HCV dual infection. *Dig Dis Sci.* 2004; 49:281 – 288
- [57] **Hayden MS, Ghosh S.** Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* 2004; 18:2195 – 2224
- [58] **Darnell JE Jr.** STATs and gene regulation. *Science.* 1997; 277:630 – 635

- [59] **Ono SK, Kato N, Shiratori Y, Kato J, Goto T, Schinazi RF, Carrilho FJ, Omata M.** The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest.* 2001; 107:449 – 455
- [60] **Gunther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H.** Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res.* 1999; 52:25 – 137
- [61] **Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D.** Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepato.* 2001; 34:617 – 624
- [62] **Naoumov NV, Schneider, R, Grotzinger T, Jung MC, Miska S, Pape GR, Will H.** Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastro.* 1992; 102:538 – 543
- [63] **Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E.** A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med.* 1991; 324:1705 – 1709
- [64] **Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M.** Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med.* 1991; 324:1699 – 1704
- [65] **Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T.** a case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotype B and C. *Hepat.* 2001; 33:218 – 223
- [66] **Zhong S, Chan JY, Yeo W, Tam JS, Johnson PJ.** Frequent integration of precore/core mutants of hepatitis B virus in human hepatocellular carcinoma tissue. *J Vir Hepat.* 2000; 7:115 – 123
- [67] **Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM.** The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med.* 1997; 336:347 – 356
- [68] **Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS.** Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepat.* 2000; 33:998 – 1002

- [69] **Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan KH, Carrilho FJ, Omata M.** YMDD Motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: a study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepat.* 1999; 29:939 – 945
- [70] **Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR.** Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepat.* 1998; 27:628 – 633
- [71] **Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Lan KH, Yoshida H, Carrilho FJ, Omata M.** Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Invest.* 1999; 103:1635 – 1640
- [72] **Bock CT, Tillmann HL, Torresi J, Klempnauer J, Locarnini S, Manns MP, Trautwein C.** Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastro.* 2002; 122:264 – 273
- [73] **Guidotti LG, Matzke B, Pasquinelli C, Shoenberger JM, Rogler CE, Chisari FV.** The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Vir.* 1996; 70:7056 – 7061
- [74] **Jeong JK, Yoon, GS, Ryu, WS.** Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J Vir.* 2000; 74:5502 – 5508
- [75] **Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T.** Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Vir.* 1994; 68:8102 – 8110
- [76] **Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, Sakuma I, Ikeda T, Tozuka S, Izumi N, Marumo F, Sato C.** Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med Vir.* 1996; 49:115 – 123

- [77] **Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH.** Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: Implications for HBeAg status and disease. *J Gen Vir.* 1997; 78:1469 – 1478
- [78] **Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P.** Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis.* 1999; 9:775 – 782
- [79] **Baptista M, Kramvis A, Kew MC.** High prevalence of 1762(T) 1764(A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. *Hepat.* 1999; 29:946 – 953
- [80] **Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS.** Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastro.* 2003; 124:327 – 334
- [81] **Sirma H, Giannini C, Poussin K.** Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Onco.* 1999; 18:4848 – 4859
- [82] **Chen RYM, Bowden S, Desmond PV, Dean J, Locarnini S.** Effects of interferon alpha therapy on the catalytic domains of the polymerase gene and basal core promoter, precore and core regions of hepatitis B virus. *J Gastr Hepat.* 2003; 18:630 – 637
- [83] **Lok AS, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi, A, Grazi GL, Jovine E, Benardi M, Andreone P.** Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepat.* 2000; 32:1145 – 1153
- [84] **Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C.** Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepat.* 2000; 32:847 – 851
- [85] **Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman, ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL.**



- Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2003; 348:808 – 816
- [86] **Perrillo R, Schiff E, Yoshida E, Statler A, Hirsch K, Wright T, Gutfreund K, Lamy P, Murray A.** Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepat.* 2000; 32:129 – 134
- [87] **Yotsuyanagi H, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kato T, Nishioka K, Takayama T, Makuuchi M, Iino S, Kimura S, Koike K.** Virologic analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: frequent involvement of hepatitis B virus. *J Infect Dis.* 2000; 181:1920 – 1928
- [88] **Kew MC, Yu MC, Kedda MA, Coppin A, Sarkin A, Hodgkinson J.** The relative roles of hepatitis B and C viruses in the etiology of hepatocellular carcinoma in Southern African blacks. *Gastro.* 1997; 112:184 – 187
- [89] **Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YHW.** Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Vir.* 1993; 67:5823 – 5832
- [90] **Murakami, S.** Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastro.* 2001; 36:651 – 660
- [91] **Zoulim F, Saputelli J, Seeger C.** Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Vir.* 1994; 68:2026 – 2030
- [92] **Klein N, Schneider RJ.** Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO.* 1999; 18:5019 – 5027
- [93] **Blum HE, Zhang ZS, Galun E.** Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J Vir.* 1992; 66:1223 – 1227
- [94] **Chirillo P, Pagano S, Natoli G.** The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:8162 – 8167
- [95] **Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF.** Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an

- autocrine factor that preferentially induces NF- $\kappa$ B p50. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:5678 – 5689
- [96] **Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GCN, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, Ulevitch RJ.** Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest.* 1998; 102:1645 – 1652
- [97] **Hirai H, Suzuki T, Fujisawa J, Inoue J, Yoshida M.** Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor  $\kappa$ B and induces nuclear translocation of transcription factor NF- $\kappa$ B proteins for transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:3584 – 3588
- [98] **Herrero JA, Mathew P, Paya CV.** LMP-1 activates NF- $\kappa$ B by targeting the inhibitory molecule I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Vir.* 1995;69:2168 – 2174
- [99] **Brockmann JA, Scherer DC, McKinsey TA, Hall SM, Qi X, Lee WY, Ballard DW.** Coupling of a signal response domain in I $\kappa$ B $\alpha$  to multiple pathways for NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol.* 1995; 15:2809 – 2818
- [100] **Karin M, Delhase M.** The I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol.* 2000; 12:85 – 98
- [101] **Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S.** The phosphorylation status of nuclear NF- $\kappa$ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell.* 2002; 9:625 – 636
- [102] **Sha WC, Liou HC, Toumanen EI, Baltimore D.** Targeted disruption of the p50 subunit of NF- $\kappa$ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell.* 1995; 80:321 – 330
- [103] **Waris G, Huh KW, Siddiqui A.** Mitochondrally associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF- $\kappa$ B via oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:7721 – 7730
- [104] **Rahmani Z, Huh KW, Lasher RL, Siddiqui A.** Hepatitis B virus X protein colocalize to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, hVDAC3 and alters its transmembrane potential. *J Vir.* 2000; 74:2840 – 2846

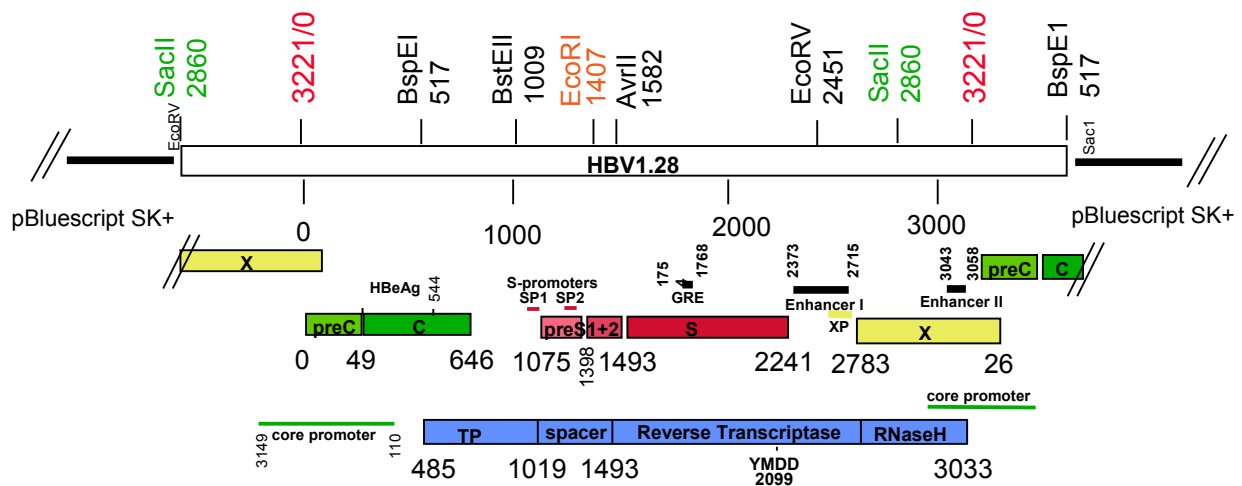
- [105] **Korenaga M, Okuda M, Otani K, Wang T, Li Y, Weinman SA.** Mitochondrial dysfunction in hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39:162 – 166
- [106] **Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T.** IL-6 induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*. 1993; 260:1808 – 1810
- [107] **Taga T, Kishimoto T.** Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:797 – 819
- [108] **Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S.** Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*. 1994; 263:92 – 95
- [109] **Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD.** Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*. 1995; 267:1349 – 1353
- [110] **Sriram K, Benkovic A, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP.** Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 Pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration. *J Biol Chem*. 2004; 279:19936 – 19947
- [111] **Lee YH, Yun Y.** HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem*. 1998; 273:25510 – 25515
- [112] **Blindenbacher A, Duong FHT, Hunziker L, Stutvoet STD, Wang X, Terracciano L, Moradpour D, Blum HE, Alonzi T, Tripodi M, Monica NL, Heim MH.** Expression of hepatitis C virus proteins inhibits Interferon  $\alpha$  signaling in the liver of transgenic mice. *Gastro*. 2003; 124:1465 – 1475

## 8 Anhang

HCV spezifische Sequenzen sind fett gedruckt

### 8.1 pHBV1.28 (Genotyp A, Subtyp adw2)

**Plasmidkarte von pHBV1.28**  
(7046 bp; HBV 1.28 mer = 4099 bp in pBluescript KS+,  
subtype adw2) Genebank No. AF305422



```

1   ctaaattgta agcgттаата ttttgттaаа attcgcgтта aattttttgтт
51  aaatcagctc atttttttaac caataggccg aaatcgгcaa aatccottat
101 aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtgттgttc cagттtgгaa
151 caagagtcca ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa
201 ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt
251 tttttggggт cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggгag
301 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg
351 aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg
401 gtcacgctgc gcgtaaccac cacaccgccc gcgттaatg cgccgtaca
451 gggcgcgтcc cattcgccat tcaggctgcg caactgттгг gaaggгcgat
501 cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct
551 gcaaggcgat taagттgggt aacgccaggг ttttcccagt cacgacgttg
601 taaaacgacg gccagtгagc gcgcgтаата cgactcacta tagggcgaat
651 tgggtaccgг gccccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gттtgatatc
701 gaattcctgc agcccggggg atccactagt tctagagcgг ccgccaccgc

```

```

751  ggacgacccc  tcgcgggggcc  gcttgggact  ctctcgtccc  cttctccgtc
801  tgccgttcca  gccgaccacg  gggcgcacct  ctctttacgc  ggtctccccg
851  tctgtgcctt  ctcatctgcc  ggtccgtgtg  cacttcgctt  cacctctgca
901  cgttgcatgg  agaccacgt  gaacgcccac  cagatcctgc  ccaaggctct
951  acataagagg  actcttggac  tcccagcaat  gtcaacgacc  gaccttgagg
1001 cctacttcaa  agactgtgtg  ttttaaggact  gggaggagct  gggggaggag
1051 attaggttaa  aggtctttgt  attaggaggc  tgtaggcata  aattgggtctg
1101 cgcaccagca  ccatgcaact  ttttcacctc  tgcctaatac  tctcttgtac
1151 atgtcccact  gttcaagcct  ccaagctgtg  ccttgggtgg  ctttggggca
1201 tggacattga  cccttataaa  gaatttggag  ctactgtgga  gttactctcg
1251 tttttgcctt  ctgacttctt  tccttccgtc  agagatctcc  tagacaccgc
1301 ctgagctctg  tatcgagaag  ccttagagtc  tcctgagcat  tgctcacctc
1351 accatactgc  actcaggcaa  gccattctct  gctgggggga  attgatgact
1401 ctagctacct  ggggtgggtaa  taatttggaa  gatccagcat  ccagggatct
1451 agtagtcaat  tatgttaata  ctaacatggg  tttaaagatc  aggcaactat
1501 tgtggtttca  tatactttgc  cttacttttg  gaagagagac  tgtacttgaa
1551 tatttggctc  ctttcggagt  gtggattcgc  actcctccag  cctatagacc
1601 accaaatgcc  cctatcttat  caacacttcc  ggaaactact  gttgttagac
1651 gacgggaccg  aggcaggtcc  cctagaagaa  gaactccctc  gcctcgcaga
1701 cgcagatctc  aatcgccgcg  tcgcagaaga  tctcaatctc  gggaaatctc
1751 atgttagtat  tccttggact  cataagggtg  gaaactttac  ggggctttat
1801 tcctctacag  tacctatctt  taatcctgaa  tggcaaactc  cttcctttcc
1851 taagattcat  ttacaagagg  acattattaa  taggtgtcaa  caatttgtgg
1901 gccctctcac  tgtaaataaa  aagagaagat  tgaaattaat  tatgcctgct
1951 agattctatc  ctaccacac  taaatatttg  cccttagaca  aaggaattaa
2001 accttattat  ccagatcagg  tagttaatca  ttacttccaa  accagacatt
2051 atttacatac  tctttggaag  gctgggtatt  tatataagag  ggaaaccaca
2101 cgtagcgcac  cattttgcgg  gtcaccatat  tcttgggaac  aagagctaca
2151 gcatgggagg  ttggtcatca  aaacctcgca  aaggcatggg  gacgaatctt
2201 tctgttccca  accctctggg  attctttccc  gatcatcagt  tggaccctgc
2251 attcggagcc  aactcaaaca  atccagattg  ggacttcaac  cccatcaagg
2301 accactggcc  agcagccaac  caggtaggag  tgggagcatt  cgggccaggg
2351 ctacccctc  cacacggcgg  tattttgggg  tggagccctc  aggtcagggg
2401 catattgacc  acagtgtcaa  caattcctcc  tcctgcctcc  accaatcggc
2451 agtcaggaag  gcagcctact  cccatctctc  cacctctaag  agacagtcac
2501 cctcaggcca  tgcagtggaa  ttccactgcc  ttccaccaag  ctctgcagga
2551 tcccagagtc  aggggtctgt  atcttcctgc  tgggtggctcc  agttcaggaa
2601 cagtaaacc  tgctccgaat  attgcctctc  acatctcgtc  aatctccgcg
2651 aggactgggg  accctgtgac  gaacatggag  aacatcacat  caggattcct
2701 aggaccctg  ctctgtttac  aggcgggggt  tttcttgttg  acaagaatcc
2751 tcacaatacc  gcagagtcta  gactcgtggt  ggacttctct  caattttcta
2801 gggggatctc  ccgtgtgtct  tggccaaaat  tcgcagtccc  caacctccaa

```

```

2851 tcactcacca acctcctgtc ctccaatttg tcctgggttat cgctggatgt
2901 gtctgcggcg ttttatcata ttctcttca tcctgctgct atgcctcatc
2951 ttcttattgg ttcttctgga ttatcaaggt atgttgcccg tttgtcctct
3001 aattccagga tcaacaacaa ccagtacggg accatgcaaa acctgcacga
3051 ctctgctca aggcaactct atgtttccct catgttgctg tacaaaacct
3101 acggatggaa attgcacctg tattcccatc ccatcgtcct gggctttcgc
3151 aaaataccta tgggagtggg cctcagtcgg tttctcttgg ctcagtttac
3201 tagtgccatt tgttcagtgg ttcgtagggc tttccccac tgtttggctt
3251 tcagctatat ggatgatgtg gtattggggg ccaagtctgt acagcatcgt
3301 gagtcccttt ataccgctgt taccaatttt cttttgtctc tgggtataca
3351 tttaaacctt aacaaaacaa aaagatgggg ttattcccta aacttcatgg
3401 gctacataat tggaagtggg ggaactttgc cacaggatca tattgtacaa
3451 aagatcaaac actgttttag aaaacttcct gttaacaggc ctattgattg
3501 gaaagtatgt caaagaattg tgggtctttt gggctttgct gctccattta
3551 cacaatgtgg atatcctgcc ttaatgcctt tgtatgcatg tatacaagct
3601 aaacaggctt tcactttctc gccaaacttac aaggcctttc taagtaaaca
3651 gtacatgaac ctttaccctg ttgctcggca acggcctggt ctgtgccaa
3701 tgtttgctga cgcaaccccc actggctggg gcttggccat aggccatcag
3751 cgcagcgtg gaacctttgt ggctcctctg ccgatccata ctgcggaact
3801 cctagccgct tgttttgctc gcagccggtc tggagcaaag ctcatcggaa
3851 ctgacaattc tgtcgtcctc tcgcggaaat atacatcgtt tccatggctg
3901 ctaggctgta ctgccaaact gatccttcgc gggacgtcct ttgtttacgt
3951 cccgtcggcg ctgaatcccg cggacgacct ctcgcggggc cgcttgggac
4001 tctctcgtcc ctttctccgt ctgccgttcc agccgaccac ggggcgcacc
4051 tctctttacg cggctctccc gtctgtgcct tctcatctgc cggctccgtg
4101 gcacttcgct tcacctctgc acgttgcatg gagaccaccg tgaacgcca
4151tcagatcctg cccaaggtct tacataagag gactcttgga ctcccagcaa
4201 tgtcaacgac cgaccttgag gcctacttca aagactgtgt gtttaaggac
4251 tgggaggagc tgggggagga gattaggtta aaggcttttg tattaggagg
4301 ctgtaggcat aaattggtct gcgcaccagc accatgcaac tttttcacct
4351 ctgcctaata atctcttgta catgtccac tgttcaagcc tccaagctgt
4401 gccttgggtg gctttggggc atggacattg acccttataa agaatttgga
4451 gctactgtgg agttactctc gtttttgctt totgacttct ttcttccgt
4501 cagagatctc ctagacaccg cctcagctct gtatcgagaa gccttagagt
4551 ctctgagca ttgctcacct caccatactg cactcaggca agccattctc
4601 tgctgggggg aattgatgac tctagctacc tgggtgggta ataatttgga
4651 agatccagca tccagggatc tagtagtcaa ttatgttaat actaacatgg
4701 gtttaaagat caggcaacta ttgtggtttc atatatcttg ccttactttt
4751 ggaagagaga ctgtacttga atatttggtc tctttcggag tgtggattcg
4801 cactcctcca gcctatagac caccaaagtc ccctccggag agctccagct
4851 tttgttccct ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatgggtc
4901 tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat

```

```

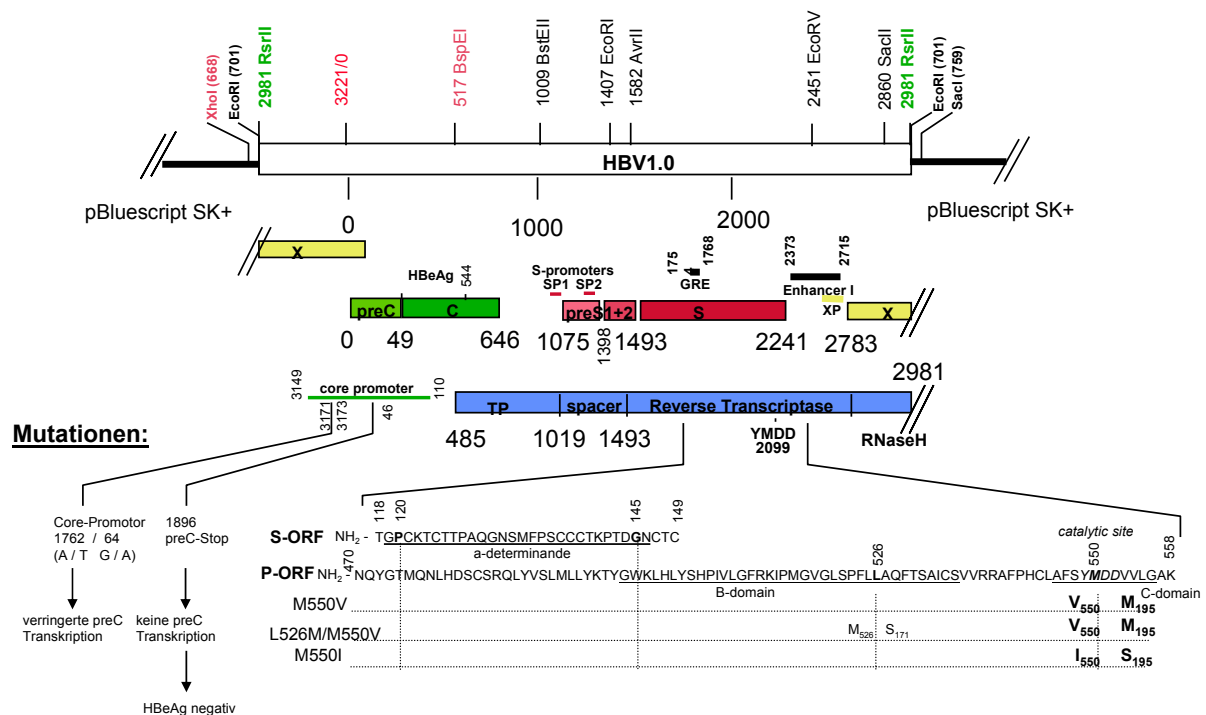
4951 acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgaagct
5001 aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac
5051 ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg
5101 tttgcgtatt gggcgcctct ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct
5151 cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaaa ggcgtaata
5201 cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa
5251 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt
5301 tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt
5351 cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc
5401 tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgtttcc gaccctgccg cttaccggat
5451 acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca
5501 cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg
5551 tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact
5601 atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca
5651 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga
5701 gttcttgaag tggtaggcta actacggcta cactagaagg acagtatttg
5751 gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc
5801 tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg
5851 caagcagcag attacgcga gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga
5901 tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg
5951 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa
6001 ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tataatatgag taaacttggt
6051 ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt
6101 ctatttcgtt catccatagt tgctgactc cccgtcgtgt agataactac
6151 gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag
6201 acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga
6251 agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc
6301 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt
6351 tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg
6401 tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac
6451 atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggc tagctccttc ggtcctccga
6501 tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca
6551 gactgcata attctcttac tgtcatgcc a tccgtaagat gcttttctgt
6601 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac
6651 cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc
6701 agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact
6751 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg
6801 caccactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga
6851 gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa ggcgcacgc
6901 gaaatgttga atactcatc tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt
6951 atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa
7001 aataaaciaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccac

```

## 8.2 HBV-Mutationen

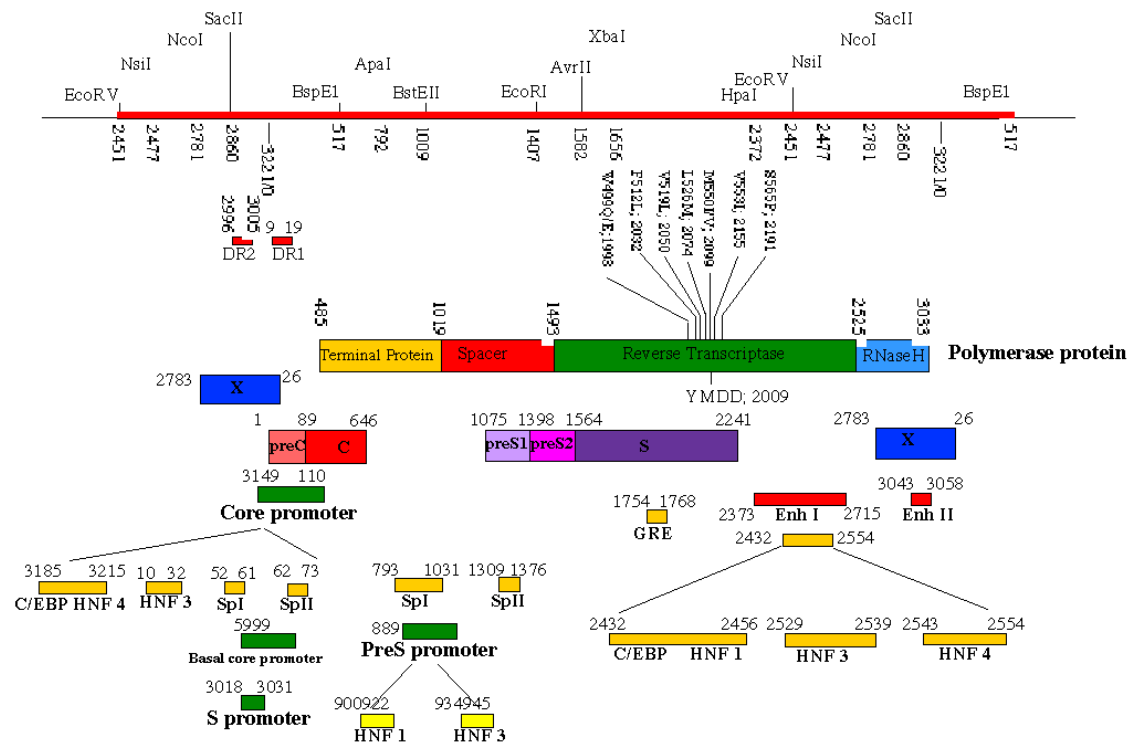
### Plasmidkarte von pHBV1.0

(6193 bp; HBV 1.0mer = 3221 bp in pBluescript SK<sup>+</sup>-RsrII, subtype adw2)



## 8.3 pHBV1.5

Map of HBV1.5 in pBluescript KS<sup>+</sup> (7464 bp; HBV 1.5 mer = 4518 bp)





## 8.4 pcDNA3.1-HCVcore

851	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	
901	gtttaaactt	aagcttcctg	atagggtgct	tgcgagtgcc	ccgggaggtc	
951	tcgtagaccg	tgcattcatga	<b>gcacaaatcc</b>	<b>taaacctcaa</b>	<b>agaaaaacca</b>	<u>HCV core</u>
1001	<b>aacgtaacac</b>	<b>caaccgccgc</b>	<b>ccacaggacg</b>	<b>ttaagttccc</b>	<b>gggcggtggt</b>	
1051	<b>cagatcgttg</b>	<b>gtggagttta</b>	<b>cctgttgccg</b>	<b>cgcaggggcc</b>	<b>ccaggttggg</b>	
1101	<b>tgtgcgcgcg</b>	<b>actaggaaga</b>	<b>cttccgagcg</b>	<b>gtcgcacacct</b>	<b>cgtggaaggc</b>	
1151	<b>gacaacctat</b>	<b>ccccaaggct</b>	<b>cgccggccccg</b>	<b>agggtaggac</b>	<b>ctgggctcag</b>	
1201	<b>cccgggtacc</b>	<b>cttggccccct</b>	<b>ctatggcaac</b>	<b>gagggtatgg</b>	<b>ggtgggcagg</b>	
1251	<b>atggctcctg</b>	<b>tcaccccgctg</b>	<b>gctctcggcc</b>	<b>tagttggggc</b>	<b>cccacagacc</b>	
1301	<b>cccggcgtag</b>	<b>gtcgcgtaaat</b>	<b>ttgggtaagg</b>	<b>tcatcgatac</b>	<b>ccttacatgc</b>	
1351	<b>ggcttcgccg</b>	<b>acctcatggg</b>	<b>gtacattccg</b>	<b>cttgtcggcg</b>	<b>ccccctagg</b>	
1401	<b>aggcgctgcc</b>	<b>agggccctgg</b>	<b>cgcattggcg</b>	<b>ccgggttctg</b>	<b>gaggacggcg</b>	
1451	<b>tgaactatgc</b>	<b>aacagggaat</b>	<b>ctgcccgggt</b>	<b>gctctttctc</b>	<b>tatcttcctc</b>	
1501	<b>ttagctttgc</b>	<b>tgtcttggtt</b>	<b>gaccatccca</b>	<b>gcttccgctt</b>	<b>acgaggtgcg</b>	
1551	caacgtgtcc	gggataatac	atgtcacgaa	cgactgctcc	aactcaagta	
1601	ttgtgtatga	ggcagcggac	atgatcatgc	acacccccgg	gtgcgtgccc	
1651	tgcgtccggg	agagtaattt	ctcccgttgc	tggatccact	agtccagtgt	
1701	ggtggaattc	tgcagatatc	cagcacagtg	gcggccgctc	gagtctagag	
1751	ggccccgtta	aacccgctga	tcagcctcga	ctgtgccttc	tagttgccag	

## 9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ala	Alanin (A)
Arg	Arginin (R)
Asp	Asparagin (D)
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCP	basal core promoter
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CMV	Cytomegalievirus
cDNA	copy-DNA
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DM	double mutation
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N;N',N'-Ethyldiamintetraacetat
Fa.	Firma
FCS	fetal calf serum
G	Guanin
Ile	Isoleucin (I)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilo-Dalton
Lys	Lysin (K)
mg	Milligramm
mM	Millimolar
mMol	Millimol
Met	Methionin (M)
mRNA	messenger RNA
NLS	nuclear localisation sequence
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	offenes Leseraster ("open reading frame")
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PreC	preCore-Region
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
RT	reverse transkription
Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat ("sodium dodecyl sulfate")
SM	single mutation
T	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin (Y)
U	Einheit ("unit")
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
wt	Wildtyp
x-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glaktopyranosid

## Lebenslauf

Name:	Christina Gehrke
Geburtsdatum:	09.05.1976
Geburtsort:	Gehrden
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
seit Februar 2003:	wissenschaftliche Assistentin an der Medizinischen Hochschule Hannover
2001 - 01/2003:	Diplomarbeit am Institut für Phytomedizin der Universität Hannover, Abt. Pflanzen- virologie; Thema: „Untersuchung zu Rekombinations- ereignissen im Bereich des Hüllproteingens des <i>Plum Pox Virus</i> “
1997 – 2003:	Gartenbaustudium an der Universität Hannover
1995 – 1997:	Ausbildung zur Gärtnerin in der Zierpflanzen- gärtnerei Pöpperling (Hannover-Ahlem)
1995:	Abitur am Ganztagsgymnasium am Spalterhals

## **Publikationen**

**F. Tacke, C. Gehrke, T. Luedde, A. Heim, M. P. Manns, and C. Trautwein.** Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of lamivudine-resistant mutants. *Journal of Virology*; August 2004;

## **Kongressbeiträge:**

### **Posterpräsentationen auf internationalen Kongressen:**

1. **F. Tacke, S. Bocklage, C. Gehrke, C. Klein, M. P. Manns, C. Trautwein.** Basal PreS2/S-Promoter activity and inducibility for hepatitis B virus surface antigen expression is controlled by CREB and PKA. *Jahrestagung der American Association for the study of liver disease (AASLD)*. Boston, Oktober 2003
2. **F. Tacke, C. Gehrke, A. Heim, M. P. Manns, C. Trautwein.** Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of lamivudine-resistant mutants. *Jahrestagung der European Association for the study of liver disease (EASL)*. Berlin, April 2004

### **Posterpräsentationen auf deutschen Kongressen:**

1. **F. Tacke, C. Gehrke, A. Heim, M. P. Manns, C. Trautwein.** Basale Core Promoter und Precore Mutationen im Hepatitis B Virus Genom steigern die Virusreplikation von Lamivudin-resistenten Mutanten. *Jahrestagung der German Association for the study of liver disease (GASL)*. Freiburg, Januar 2004
2. **F. Tacke, C. Gehrke, A. Heim, M. P. Manns, C. Trautwein.** Die Virusreplikation Lamivudin-resistenter Hepatitis B Virus Mutanten wird durch Basale Core Promoter- und Precore-Mutationen erhöht. *Jahrestagung der*

„Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen“  
(DGVS). Nürnberg, 2004

**Mündliche Präsentationen auf internationalen Kongressen:**

1. **C. Gehrke, C. Klein, N. Woller, M. P. Manns, C. Trautwein.** *In vivo* suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in a hydrodynamic-transfection-model in mice. *Jahrestagung der European Association for the study of liver disease (EASL). Paris, April 2005*

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Alle benutzten Hilfsmittel und zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen sind vollständig angegeben.

Hannover, den 24. Juni 2005

Christina Gehrke



# Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Christian Trautwein** und **Prof. Dr. Michael P. Manns** für die Ermöglichung meiner Promotion in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie und für die Bereitstellung der Forschungsgelder für meine BAT2a/2-Stelle bedanken.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Christian Klein**, der mich stets motiviert und aufgebaut hat, wenn Versuche nicht gelingen wollten. Ohne seinen wissenschaftlichen Rat hätte ich meine Dissertation sicher nicht erfolgreich beenden können.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe und des gesamten Labors für die doch so gute Zusammenarbeit, trotz räumlicher Enge. Ich danke **Dr. Nils-Holger Zschemisch** für das Korrigieren meiner Arbeit.

Großer Dank gebührt meinen Eltern **Wilfriede** und **Karl-Heinz Gehrke** für die finanzielle Unterstützung, ohne die mir meine Ausbildung und das Studium unmöglich gewesen wären und die meine berufliche Fortbildung immer mit viel Interesse verfolgt haben.